

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Experimentální chirurgie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. et MDDr. Martin Bartoš

Preklinické využití a kritické zhodnocení mikro-CT
z pohledu orální a maxilofaciální chirurgie

Preclinical use and critical evaluation of micro-CT
from the perspective of oral and maxillofacial surgery

Typ závěrečné práce

Disertační

Školitel: prof. MUDr. et MUDr. René Foltán, Ph.D., FEBOMFS

Konzultant: odb. as. Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobností kvalifikačních prací.

V Praze, 12. 12. 2019

Podpis

Identifikační záznam:

BARTOŠ, Martin. Preklinické využití a kritické zhodnocení mikro-CT z pohledu orální a maxilofaciální chirurgie. [Preclinical use and critical evaluation of micro-CT from the perspective of oral and maxillofacial surgery]. Praha, 2019. 100 stran, 8 příloh. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Stomatologická klinika 1. LF UK. Školitel Foltán René.

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval prof. MUDr. et MUDr. René Foltánovi, Ph.D., FEBOMFS za vedení mého postgraduálního studia, cenné rady a všestrannou podporu, která mi umožnila věnovat se mikro-CT na Stomatologické klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Rovněž tímto děkuji odb. as. Ing. Tomáši Suchému, Ph.D. za četné konzultace, které mne obohatily o řadu poznatků. Děkuji také všem ostatním kolegům a spolupracovníkům za průběžnou podporu při psaní této práce, kterou mi poskytovali.

Velice děkuji i svým rodičům, bratrovi a své manželce za vstřícnost, pochopení, trpělivost a podporu, která mne stále provází.

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů

Abstrakt

1. Úvod a cíle práce	11
2. Popis současného stavu poznání řešeného tématu	13
2.1 Mikrotomografie (mikro-CT): principy a možnosti	13
2.1.1 Úvod	
2.1.2 Princip mikro-CT a základní typy přístrojů	
2.1.3 Proces skenování a zpracování dat	
2.1.4 Analýza obrazových dat	
2.2 Mikro-CT hodnocení tkáňových nosičů pro kostní regeneraci	31
2.2.1 Tkáňové inženýrství	
2.2.2 Tkáňové nosiče – scaffoldy	
2.2.3 Význam buněk a signálních molekul v tkáňovém inženýrství	
2.2.4 Mikro-CT hodnocení tkáňových nosičů	
2.3 Mikro-CT hodnocení kovového resorbovatelného osteosyntetického materiálu	43
2.3.1 Úvod	
2.3.2 Resorbovatelné osteosyntetické materiály	
2.3.3 Mikro-CT hodnocení degradace resorbovatelných kovů v biologickém prostředí	
3. Metodika: využití mikro-CT	46
3.1 Příprava vzorků ke skenování	
3.2 Mikro-CT skenování	
3.3 Rekonstrukce projekčních snímků	
3.4 Vizualizace	
3.5 Modifikace dat a jejich analýza	
4. Výsledky a diskuse (včetně komentáře k prezentovaným publikacím)	51
4.1 Validace a kritické zhodnocení mikro-CT analýzy	51
4.1.1 Porovnání hodnocení porozity tkáňových nosičů pomocí mikro-CT a skenovací elektronové mikroskopie (SEM)	
4.1.2 Možnost virtuální kalibrace mikro-CT analýzy	
4.1.3 Srovnání hodnocení struktury kostní tkáně pomocí mikro-CT a histologie	
4.2 Mikro-CT tkáňových nosičů	64
4.2.1 Charakterizace a testování PLA tkáňových nosičů připravených 3D tiskem	
4.2.2 Změny kolagenových tkáňových nosičů v důsledku hydratace	
4.2.3 Charakterizace 3D struktury kostních tkáňových nosičů připravovaných pro osazování buňkami	

4.2.4	Stručné shrnutí mikro-CT při hodnocení tkáňových nosičů	
4.3	Biodegradabilní osteosyntetický materiál v <i>in-vivo</i> experimentu	73
4.3.1	Vizualizace a analýza rozpadu hořčíkových slitin	
4.4	Vybrané aspekty mikro-CT	77
4.4.1	Výhody mikro-CT	
4.4.2	Nevýhody a limitace mikro-CT	
4.4.3	Mikro-CT tkáňových nosičů: standardní metoda bez standardizace	
4.4.4	Tkáňové nosiče a segmentace obrazu	
5.	Závěry	85
6.	Publikované práce autora (IF) ve vztahu k dizertaci – seznam	87
7.	Literatura	89
8.	Přílohy – práce autora publikované v časopisech s IF	100
8.1	Note on the use of different approaches to determine the pore sizes of tissue engineering scaffolds: what do we measure?	
8.2	Generating standardized image data for testing and calibrating quantification of volumes, surfaces, lengths and object counts in fibrous and porous materials using Xray microtomography	
8.3	Comparison of ground sections, paraffin sections and micro-CT imaging of bone from the epiphysis of the porcine femur for quantitative histological evaluation	
8.4	Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer	
8.5	Dry versus hydrated collagen scaffolds: are dry states representative of hydrated states?	
8.6	Micro-CT in tissue engineering scaffolds designed for bone regeneration: principles and application	
8.7	Positive impact of dynamic seeding of mesenchymal stem cells on bone-like biodegradable scaffolds with increased content of calcium phosphate nanoparticles	
8.8	In vivo study on biodegradable magnesium alloys: Bone healing around WE43 screws	

Seznam použitých zkratk a symbolů

2D	2-dimensional, dvourozměrný
3D	3-dimensional, trojrozměrný
β -TCP	beta-trikalciumfosfát
AECD	area equivalent circle diameter, průměr kruhu ekvivalentního obsahu
BCP	bifázický kalciumfosfát
BIC	bone-implant contact, spojení implantátu s kostní tkání
BICD	biggest inner circle diameter, průměr největšího vepsaného kruhu
BMD	bone mineral density, kostní denzita
BMP	bone morphogenetic protein, kostní morfogenetický protein
BSSO	bilateral sagittal split osteotomy, bilaterální sagitální osteotomie mandibuly
CAD	computer aided design, počítačem podporované projektování
CCD	charge-coupled device, zařízení s vázanými náboji
CT	computed tomography, výpočetní tomografie
CaP	kalciumfosfát
ED	embryonic day, den embryonálního vývoje
EBM	evidence based medicine, medicína založená na důkazech
EKG	elektrokardiografie
FEM	finite element method, metoda konečných prvků
FGF	fibroblast growth factor, růstový faktor fibroblastů
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GB	gigabyte, gigabyt
GBR	guided bone regeneration, řízená kostní regenerace
GTR	guided tissue regeneration, řízená tkáňová regenerace
HAP	hydroxyapatit

iPSC	induced pluripotent stem cells, indukované pluripotentní kmenové buňky
IGF	insulin-like growth factor, inzulinu podobný růstový faktor
MD	major diameter, největší průměr
Mikro-CT	mikrotomografie, micro-computed tomography (micro-CT)
MKP	metoda konečných prvků, finite element method
MRI	magnetic resonance imaging, magnetická rezonance
MSC	mesenchymal stem cells, mesenchymální kmenové buňky
MT	mean thickness, průměrná tloušťka
Nano-CT	nano-computed tomography, nanotomografie
Obj.V.	object volume, objem objektu
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
PDGF	platelet-derived growth factor, destičkový růstový faktor
Pixel	picture element, obrazový prvek
PGA	poly-glycolic acid, kyselina polyglykolová
PLA	poly-lactid acid, kyselina polymléčná
PDLA, PLLA	poly-(D-laktid), poly-(L-laktid)
PDLLA	kopolymer kyseliny poly D- a L-mléčné
PRP	platelet-rich plasma, plasma bohatá na destičky
PTA	phosphotungstic acid, fosfowolframová kyselina
RCT	randomized control trial, randomizovaná kontrolovaná studie
ROI	region of interest, oblast zájmu
RTG	rentgen
SEM	scanning electron microscopy, skenovací elektronová mikroskopie
SMI	structure model index, bez českého ekvivalentu
TB	terabyte, terabyt
TCP	trikalciumpfosfát

TE	tissue engineering, tkáňové inženýrství
TeIGen	Test Image Generator, generátor testovacích obrázků
TGF	transforming growth factor, transformující růstový faktor
TMD	tissue mineral density, tkáňová denzita
TV	total volume, celkový objem
VEGF	vascular endothelial growth factor, vaskulární růstový faktor
VOI	volume of interest, objem zájmu
Voxel	volumetric element, objemový prvek
WZ21	hořčíková slitina WZ21
ZX50	hořčíková slitina WZ21

ABSTRAKT

Preklinická zobrazovací metoda mikro-CT (mikrotomografie) umožňuje vizualizovat a kvantifikovat strukturu zkoumaných vzorků, a to s rozlišením v řádu jednotek mikrometrů. Její užití, rozšíření a význam celosvětově narůstá. Kromě řady výhod (nedestruktivita, možnost přímé 3D analýzy, časová efektivita aj.) má mikro-CT i některé limitace (problematická validace výsledků, vliv obrazových modifikací aj.). Tato práce se zabývá využitím a kritickým zhodnocením mikro-CT v oblasti výzkumu a vývoje kovových i nekovových materiálů perspektivně využitelných v klinické praxi k podpoře kostního hojení. První část se věnuje vybraným limitacím mikro-CT. Porovnali jsme mikro-CT a skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) při hodnocení velikosti pórů, což je zásadní strukturní parametr tkáňových nosičů. Práce uvádí problematičnost tohoto hodnocení a popisuje významně vyšší hodnoty dosažené pomocí SEM (přibližně trojnásobně), což umožňuje komparaci studií využívajících pouze jednu z metod. V rámci řešení otázky validace mikro-CT analýzy byl vyvinut software umožňující generování fantomových datasetů 3D objektů o definovaných strukturních parametrech, který testování analýzy umožňuje a jenž byl využit v našich projektech k optimalizaci zpracování dat. Dále jsme porovnávali hodnocení struktury kostní tkáně pomocí mikro-CT a dvou histologických metod (výbrusy a dekalcifikované parařinové řezy). Mezi mikro-CT a histologickými metodami nebyly signifikantní rozdíly, což dokládá, že mikro-CT může v tomto případě zastoupit konvenční postup, navíc s výhodou nedestruktivity, časové efektivity a možnosti vyhodnocení celého vzorku. V druhé části jsou shrnuty provedené studie zaměřené na charakterizaci tkáňových nosičů, zejména parametrů porozity, s cílem optimalizace jejich přípravy a lepší predikce chování po implantaci. Zaměřili jsme se též na změny struktury tkáňových nosičů v důsledku hydratace, ke které po implantaci dochází. Pozorovali jsme významné změny mechanických vlastností při nevýznamných změnách struktury vzorků. V rámci in-vivo experimentu byla hodnocena degradace kovového resorbovatelného osteosyntetického materiálu (hořčíková slitina WE43) stanovením změny objemu a povrchu implantátů v čase. Degradace akcelerovala po 12 týdnech hojení, objem se zmenšoval a povrch přechodně narůstal v důsledku fragmentace implantátu. Provedené studie potvrzují významný přínos zobrazovací metody mikro-CT s předpokladem jejího rozšíření a standardizace v řadě dalších výzkumných oblastí.

Klíčová slova: Mikro-CT, kostní regenerace, biomateriály, tkáňové nosiče, orální chirurgie, maxilofaciální chirurgie

ABSTRACT

The preclinical imaging method micro-CT (microtomography) allows the visualization and quantification of the structure of samples at a resolution of micrometers. Its' importance is increasing globally. In addition to several advantages (non-destructive, the possibility of direct 3D analysis, time efficiency, etc.), micro-CT also has some significant limitations (problematic validation of results, image artifacts, significant influence of image modifications, etc.). This thesis focuses on the application of micro-CT in the field of research and development of metallic and non-metallic materials promoting bone healing with their possible clinical applications. The first part addresses the limitations of micro-CT through several studies. A comparison of pore sizes in biomaterials utilizing scanning electron microscopy (SEM) and micro-CT was performed, and the complications of pore size evaluation were presented. SEM image analysis leads to significantly higher values than micro-CT (approximately three times), which allows for comparison of the studies using only one of these methods. Validation of micro-CT 3D analysis results based on calibration phantoms with complex structure, to date, is not possible. We therefore developed software generating phantom datasets of 3D objects with well-defined structural parameters. This enabled testing of micro-CT analysis accuracy, along with quantification of bias introduced by many factors (e.g. image processing or image noise). Furthermore, we compared the evaluation of bone structure using micro-CT and two histological methods (ground and decalcified paraffin sections). There were no significant differences between micro-CT and the histological methods, which proves that in this case micro-CT can replace the conventional approach with the advantages of no destruction of samples, time efficiency and whole specimen evaluation. The second part summarizes the studies carried out on the characterization of the structures of tissue engineering scaffolds, in particular their porosity, in order to optimize their fabrication and prediction of their behaviour. Tissue engineering scaffolds are usually evaluated in a dry state, so we focused on changes caused by hydration, as this always occurs after material implantation. Significant alterations of mechanical properties were observed with minimal structural changes. As part of the *in-vivo* experiment, the degradation of metal resorbable osteosynthetic material (WE43 magnesium alloy) was evaluated by determining the changes in volume and surface of the implants over time. Implant degradation accelerated after 12 weeks of healing with decrease of volume and temporary increase of surface - due to implant fragmentation. The studies carried out confirm a significant benefit of micro-CT imaging with the postulation of the future increase of its importance.

Keywords: Micro-CT, bone regeneration, biomaterial, tissue engineering scaffold, oral surgery, maxillofacial surgery

1 Úvod a cíle práce

Preklinická zobrazovací metoda mikro-CT (mikrotomografie) umožňuje vizualizovat a kvantifikovat strukturu zkoumaných vzorků, a to s rozlišením v řádu jednotek mikrometrů. Mezi její hlavní přednosti patří nedestruktivita, rozsáhlé možnosti 2D i 3D zobrazení, přímá 3D analýza za nativních podmínek, vysoké rozlišení a časová efektivita. Využití mikro-CT v posledním desetiletí celosvětově významně narůstá. Spektrum aplikací je velice široké a zahrnuje jak vědy technické, tak biologické. V řadě oblastí se použití mikro-CT postupně stává standardem (kostní biologie). Kromě mnoha předností však má tato metoda i limitace, které mohou snadno vést k chybnému hodnocení mikro-CT dat. Doposud přetrvává nejednoznačnost v metodologii užití mikro-CT, prezentaci dosažených výsledků, jejich interpretaci a validaci.

Hlavním cílem předkládané dizertační práce je aplikace mikro-CT v oblasti vývoje a testování materiálů určených k podpoře kostního hojení (tkáňové nosiče a resorbovatelný osteosyntetický materiál), které jsou perspektivní z pohledu klinické medicíny. Práce se zabývá i kritickým zhodnocením možností a limitací mikro-CT, a to včetně otázky validace výsledků. Dizertační práce je založena na souboru publikovaných prací, které jsou komentovány a diskutovány. Přehled tematických oblastí, kterým byla při doktorském studiu věnována hlavní pozornost, je uveden níže.

Řešení těchto cílů bylo zároveň spojeno se zaváděním a testováním zcela nové zobrazovací modality na pracovišti Stomatologické kliniky 1. LF UK a VFN. Dostupnost mikro-CT v České republice je prozatím poměrně nízká. Lze předpokládat, že význam mikro-CT bude trvale narůstat a že se v krátkém časovém horizontu stane zcela běžnou zobrazovací metodou. Seznámení s jejími principy a možnostmi bude důležité pro studium aktuální vědecké literatury v řadě oblastí.

Hlavní a dílčí cíle práce:

I. Validace a kritické zhodnocení mikro-CT analýzy

- a) Porovnání hodnocení porozity tkáňových nosičů pomocí mikro-CT a konvenční metody skenovací elektronové mikroskopie (SEM).
- b) Testování kalibrace mikro-CT analýzy za využití softwarově vygenerovaných datasetů 3D objektů se známými prostorovými parametry.
- c) Komparace výsledků mikro-CT a histologického hodnocení struktury kostní tkáně.

II. Mikro-CT evaluace biomateriálů s primárním zaměřením na kostní tkáňovou regeneraci

- a) Vyhodnocení 3D struktury vyvíjených tkáňových nosičů a podpora výběru vhodných typů na základě jejich prostorového uspořádání.
- b) Posouzení strukturních změn porézních kompozitních tkáňových nosičů na bázi kolagenu v průběhu jejich hydratace.
- c) Evaluace biodegradabilního osteosyntetického materiálu v *in-vivo* experimentu.

2 Popis současného stavu poznání řešeného tématu

2.1 Mikrotomografie (mikro-CT): principy a možnosti

2.1.1 Úvod

Historie a vývoj mikro-CT

Počátky mikro-CT jsou spojeny se vznikem klinických CT přístrojů. Matematické základy výpočetní tomografie poprvé uvádí rakouský matematik Johann Radon v roce 1917, kdy prokazuje možnost rekonstrukce objektu o N-dimenzích pomocí N-1 dimenzionálních projekcí (Radonova transformace). Cesta k realizaci těchto poznatků však vyžadovala dalších více než 50 let, během nichž došlo k rozvíjení původních teorií a k mohutnému rozvoji výpočetní techniky, která nakonec umožnila komplikované výpočty provést. První komerční CT přístroj byl vyroben začátkem 70. let minulého století Godfrey Hounsfieldem ve Velké Británii. Výpočetní postupy, které umožnily rekonstrukci průřezového snímku skenovaného objektu, definoval Allan McLeod Cormack, a to na základě rozvedení a adaptace doposud navržených rekonstrukčních algoritmů. V rámci dějin lékařství se jedná o událost mimořádného významu. Oba autoři za tyto objevy získali v roce 1979 Nobelovu cenu (Boerckle J. D. et al, 2014; Oransky I., 2004).

Vývoj mikro-CT byl ve srovnání s klinickým CT pozvolnější. Základním důvodem byla pochopitelná preference financování přístrojů použitelných v humánní medicíně, zatímco investice do čistě výzkumných zařízení nedosahovaly takové podpory. Mikro-CT se začalo rozvíjet až v 80. letech minulého století a jeho rozšíření bylo zpočátku velice limitované, často omezeno na prototypové přístroje různých výzkumných institucí (Stock S. R., 2009). První výsledky mikro-CT skenování byly publikovány v roce 1982 (Elliott J. C. a Dover S. D., 1982). Změna nastala v 90. letech, kdy se objevují první komerčně dostupné uživatelsky přívětivé přístroje (např. Scanco Medical, SkyScan), umožňující nedestruktivní, přesné a rychlé 2D i 3D zobrazení vzorků a analýzu jejich struktury.

První biologickou oblastí, ve které se mikro-CT plně etablovalo a brzy se stalo zlatým standardem, je kostní biologie, jejíž vzorky zajišťují dostatečný RTG kontrast, vhodnou architekturu i rozměry a stabilní strukturu (Ito M. et al., 1998; Salmon P. L. et al., 2003). Nárůst počtu studií geneticky modifikovaných experimentálních zvířat, které představují modely některých lidských onemocnění, vedl k potřebě rychlého nedestruktivního hodnocení morfologie subjektů, což mikro-CT umožňuje (Silva M. J. et al., 2004). Významnou událostí podporující rozšíření mikro-CT systémů byl také vývoj *in-vivo* přístrojů, jež umožňují opakované skenování stejného experimentálního zvířete v různých časových intervalech (např. sledování po terapeutickém zákroku či aplikaci farmaka). Toto může vést k redukci počtu použitých zvířat ve studii, což je výhodné z důvodu etických, časových i ekonomických (Schambach S. J., 2010).

Využití mikro-CT

Spektrum aplikace mikro-CT je mimořádně rozsáhlé s ohledem na potřebu zobrazování vzorků napříč obory. V základním výzkumu se mikro-CT uplatňuje jak v technických oborech, tak přírodních. Velice významné je i využití v rámci aplikovaného výzkumu či průmyslu k vývoji nových produktů, jejich testování (odhalování defektů apod.) či hodnocení procesu výroby (Ritman E. L., 2011).

V oblasti medicíny (humánní i veterinární) je mikro-CT široce aplikovatelné zejména ve výzkumu preklinickém. Příkladem širokého spektra využití je několik obecně studovaných témat v rámci kostní biologie:

- hodnocení kostní struktury: 2D i 3D morfometrie, vývoj kostí, vliv terapeutických intervencí;
- hojení kostní tkáně: průběh, testování osteosyntetického materiálu, vliv augmentačních materiálů, růstových faktorů a kmenových buněk;
- zánětlivá onemocnění: experimentálně navozená osteomyelitida, její průběh a možnosti léčby.
- degenerativní změny: experimentálně navozená osteoartritida, hodnocení průběhu destrukce tvrdých tkání a možnost léčebného ovlivnění;
- onkologický výzkum: růst a šíření nádorů, rozvoj vaskularizace, možnosti terapeutického ovlivnění;
- dentální implantologie: hodnocení osseointegrace implantátů, evaluace různých typů struktury, materiálu či povrchových modifikací;
- biomechanický výzkum: studium vztahu struktury kostní tkáně a mechanických parametrů, zatížení kosti a její deformace, využití mikro-CT dat pro matematické modelace.

Mezi nové směry vývoje patří využití mikro-CT v klinické medicíně. Jako konkrétní příklad lze uvést léčbu nádorů prsu. Bylo prokázáno, že mikro-CT umožňuje peroperačně během několika minut pomocí 2D a 3D vizualizací detekovat pozitivní okraje v resekátu, a to včetně přesného určení v prostoru. Tím je možné upravit rozsah excize a redukovat tak počet reoperací (Qiu S. Q. et al, 2018; McClatchy D. M. et al., 2018).

Význam mikro-CT se v posledních 15 letech zvyšuje, což dokazuje i narůstající počet vědeckých prací, využívajících tuto metodu. Vývoj vede k optimalizaci technických parametrů i výpočetních postupů. Dochází ke zlepšování kvality obrazu, zpřesňování a zrychlování procesů rekonstrukce obrazových dat. Komerčně dostupné přístroje jsou zároveň uživatelsky vstřícné. Jejich počet a rozšíření je v řadě oblastí, včetně České republiky, stále poměrně limitované. Lze však předpokládat, že v krátké době se stane zcela běžnou zobrazovací metodou a její alespoň základní znalost bude důležitá pro praxi jak výzkumných pracovníků, tak klinických lékařů některých oborů, neboť mnoho studií bude mikro-CT využívat.

Mikro-CT a jeho aplikace ve stomatologii a maxilofaciální chirurgii

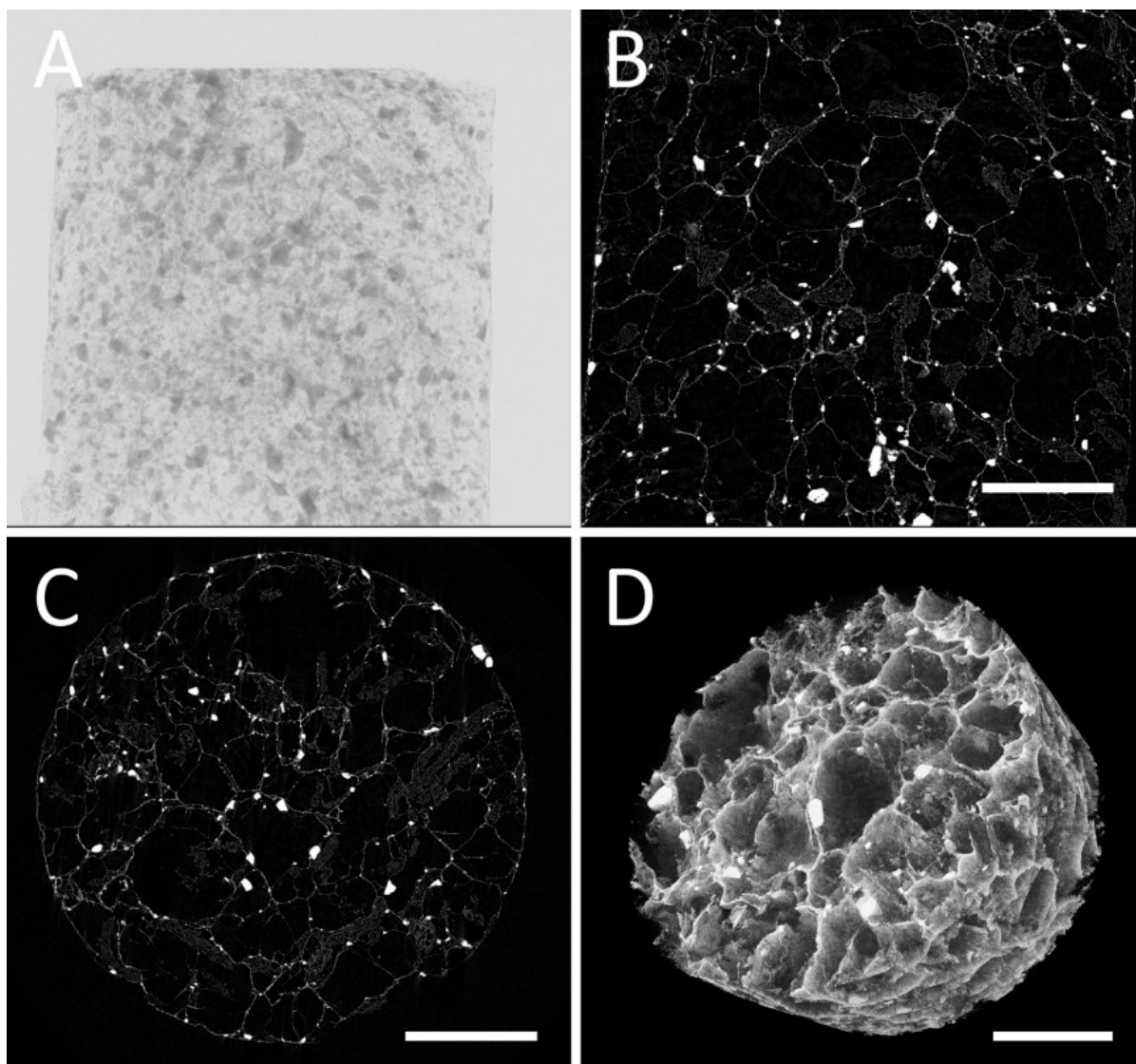
Stomatologie a maxilofaciální chirurgie je oblastí, ve které se mikro-CT již delší dobu uplatňuje a zároveň skýtá významný potenciál pro další rozvoj (Swain M. V. a Xue J., 2009). Klinické užití t.č. není možné, takže hodnocení vzorku (zub, kostní tkáň) vyžaduje jeho vyjmutí z organismu. Hodnocení struktury zubu a jeho detailní 3D anatomie je typickým příkladem využití, kdy lze hodnotit např. tloušťku skloviny, dentinu, rozměry korunky či pulpální dutiny. Mikro-CT umožňuje např. vyhodnotit počet a tvar kořenových kanálků, což je základním předpokladem úspěšného ošetření. Pomocí mikro-CT lze porovnávat efektivitu různých způsobů ošetření kořenového systému zubu, stanovit množství odpreparované zubní tkáně, detekovat defekty ve výplni či fraktury kořenů, které mohou vznikat (např. Rödiger T. et al., 2014; Rhodes J. S. et al., 1999). Hodnocením zhotovených výplní lze sledovat kvalitu okrajového uzávěru a přítomnost defektů, a to nejen na povrchu, ale i uvnitř (např. porozita; micro-leakage fotokompozitních výplní, Zavattini A. et al., 2018). Mikro-CT bylo využito i v rámci výuky stomatologie, kdy takto byla hodnocena efektivita preparace zubního kazu po konvenční či haptické metodě výuky (Ria S. et al., 2018). V rámci protetického zubního lékařství lze analyzovat přesnost preparace pilířových zubů, hodnotit ztrátu tvrdých zubních tkání či stanovit přesnost protetických prací (Pimenta M. A. et al., 2015). Na základě mikro-CT dat je možné provést biomechanické studie a hodnotit např. odolnost pilířového zubu při zatížení.

Některé oblasti aplikace mikro-CT v rámci maxilofaciální a orální chirurgie jsou rozvedeny dále v textu (2.2, 2.3), proto je uvádím stručně pouze některá témata. Využití mikro-CT v dentální implantologii umožňuje např. hodnocení kontaktu kostní tkáně s implantátem (tzn. bone-implant contact, Schouten C. et al., 2009). Takto získaná data je možné využít k matematickým modelacím k optimalizaci tvaru a povrchu implantátů. Mezi studované oblasti s perspektivou klinické aplikace patří vývoj resorbovatelného osteosyntetického materiálu, který by eliminoval řadu nevýhod konvenčních postupů (nutnost sekundární operace při potřebě vyjmutí materiálu, stress shielding aj.; Fischerauer S. F. et al., 2013). Analýza kostní regenerace orofaciální oblasti či kostní tkáně obecně patří mezi časté oblasti aplikace mikro-CT, kdy je vizualizována a kvantifikována novotvořená kostní tkáň v oblasti původního defektu (Lappalainen O. et al., 2016; Rezai-Rad M. et al., 2015; Cowan C. M. et al., 2007). Mezi další oblast využití patří studium kostních patologických stavů (např. bisfosfonátové osteochemonekrózy (Howie R. N. et al., 2016) nebo patologických stavů temporomandibulárního kloubu (Karssemakers L. H. E. et al., 2014).

2.1.2 Princip mikro-CT a základní typy přístrojů

Mikro-CT patří mezi metody založené na RTG záření, které je v přístroji nejčastěji generováno rentgenkou. Záření prochází studovaným vzorkem, interaguje s jeho strukturou a je částečně absorbováno v závislosti na složení materiálu. Pro získání obrazu vzorku je důležitá míra absorpce záření. Při příliš vysoké absorpci záření vzorkem neprojde a není zachycena žádná informace o jeho struktuře. Stejná situace nastává v případě nedostatečné absorpce (např. tenký vzorek s velmi nízkou RTG denzitou). Dostatečný RTG kontrast může být přítomný nativně nebo je možné jej doplnit kontrastními látkami, což bude diskutováno v 2.1.3. Záření, které vzorkem projde, je detekováno scintilátorem a CCD kamerou (charge coupled device). Tyto signály jsou dále zpracovávány a převedeny do obrazových dat (Stock S. R., 2009, Landis E. N. a Keane D. T, 2010).

Tímto způsobem vzniká planární obraz daného vzorku (tzv. projekční snímek, podobný konvenčnímu RTG snímku), na kterém je patrná různá atenuace záření (RTG denzita). Pokud dojde v průběhu akvizice obrazu k postupné rotaci (celkem o 180° nebo 360°) vzorku (či zdroje záření a kamery) o definovaný rotační krok, vytvoří se dataset projekčních snímků. Pomocí rekonstrukčních procesů (nejčastěji modifikovaným Feldkampovým algoritmem) může být převeden do datasetu složeného z jednotlivých průřezových snímků. Tímto vzniká „3D mapa“, kde každé základní objemové jednotce (voxel) je přiřazena určitá hodnota RTG atenuace (atenuační koeficient), která je dle nastavení převedena do hodnot stupňů šedi (grayscale; nejčastěji hodnoty 0-255). Voxel je typicky isotropní, což znamená, že všechny strany mají stejný rozměr a jedná se tedy o krychli. Tato data jsou základem pro vizualizace a následné analýzy. Příklady mikro-CT zobrazení jsou na obr. 1.



Obr. 1: Příklady mikro-CT zobrazení porézního kompozitního tkáňového nosiče (vlastní data, převzato z Bartoš et al., 2018): A) 2D projekční snímek; sada takových snímků s definovaným rotačním krokem je základem pro následnou rekonstrukci; B, C) rekonstruovaný 2D snímek ve 2 rovinách zobrazení: koronální (B) a transversální (C), 2D zobrazení umožňuje detailní hodnocení struktury a je základem pro následné 2D i 3D vizualizace a analýzy strukturních parametrů; D) 3D vizualizace vzorku; na snímcích B, C, D jsou patrné póry, jejich rozměr a tvar, matrice nosiče (stěny) a denzní částice (hydroxyapatit). Měřítko (B, C, D) = 1 mm.

Pro účely dizertační práce je uvedeno zjednodušené rozdělení mikro-CT systémů používaných v biologické oblasti výzkumu. Nejčastěji se jedná o desktop přístroje („stolní“), dělené na 2 základní typy: *in-vivo* a *ex-vivo* zařízení (viz obr. 2), na které jsou kladeny rozdílné požadavky (Holdsworth D.W. a Thornton M. M., 2002; Landis E. N. a Keane D. T., 2010).



Obr. 2: *Ex-vivo* mikro-CT přístroj
Bruker micro-CT SkyScans 1272
(převzato z Bruker micro-CT).

In-vivo skenery jsou vyvíjené pro rychlý proces akvizice snímků s co nejmenší absorbovanou dávkou RTG záření. Jejich konstrukce je uzpůsobena ke skenování živých laboratorních zvířat, nejčastěji myší a potkanů. Skenované zvíře zůstává ve stabilní pozici a zdroj záření i s detekční kamerou podstupují přesně definovanou rotaci kolem vzorku, podobně jako v případě klinických CT přístrojů. Zásadní předností je možnost opakovaného skenování stejného zvířete v různých časových intervalech. Jako příklady *in-vivo* studií lze uvést hodnocení rozvoje nádorů a vlivu léčby, modelování osteoporózy či průběhu kostního hojení (Umoh J. U. et al., 2009; Perilli E. et al., 2010). Pro tyto účely je skenovací komora speciálně upravena tak, aby zajistila stabilní prostředí (teplota, vlhkost, koncentrace plynů apod.), monitoraci (např. kardiorepirační funkce), aplikaci farmak či řízenou ventilaci. Pro následné zpracování dat je možno využít respirační či EKG gating (Badea C. T. et al., 2004), a tím kompenzovat artefakty, vznikající např. dýchacími pohyby, nebo dokonce zhotovit mikro-CT srdeční akce v reálném čase. Dosažené rozlišení je obecně nižší ve srovnání s *ex-vivo* systémy a velikost základní objemové jednoty (voxel) je většinou v řádu desítek mikrometrů. Oproti tomu je doba skenování výrazně kratší, často v rozsahu od desítek sekund po minuty. V řadě studií bylo potvrzeno, že opakované skenování experimentálních zvířat při dodržení doporučených postupů nemá negativní biologický vliv na zdravé ani patologické tkáně (např. studované implantované metastázy), avšak objevují se i názory opačné (Brouwers J. E. M et al., 2007; Carlson S. K. et al., 2007; Mustafy T. et al, 2018).

Ex-vivo přístroje nejsou obecně limitovány ani skenovacím časem, ani absorbovaným zářením a umožňují dosahovat maximálního rozlišení. Rotační pohyb v těchto systémech vykonává vzorek fixovaný na nosič a zdroj záření i kamera zůstávají stabilní. Spektrum aplikací je velice široké a zahrnuje oblasti technických, materiálových i biologických věd. Jako příklady se zaměřením na biomedicínskou aplikaci lze uvést: analýzu 3D tištěné struktury (Bittner S. M., 2019), hodnocení odebraných biologických tkání (Recker R.R. et al., 2018), hodnocení osseointegrace implantátu (Schouten C. et al., 2009), evaluaci 3D struktury tkáňových nosičů (Cengiz I. F. et al., 2018), 3D vizualizaci cévního řečiště (Kolesová et al., 2018), analýzu plnění kořenového kanálku (Gandolfi M.G. et al., 2012). Velikost voxelu je na úrovni

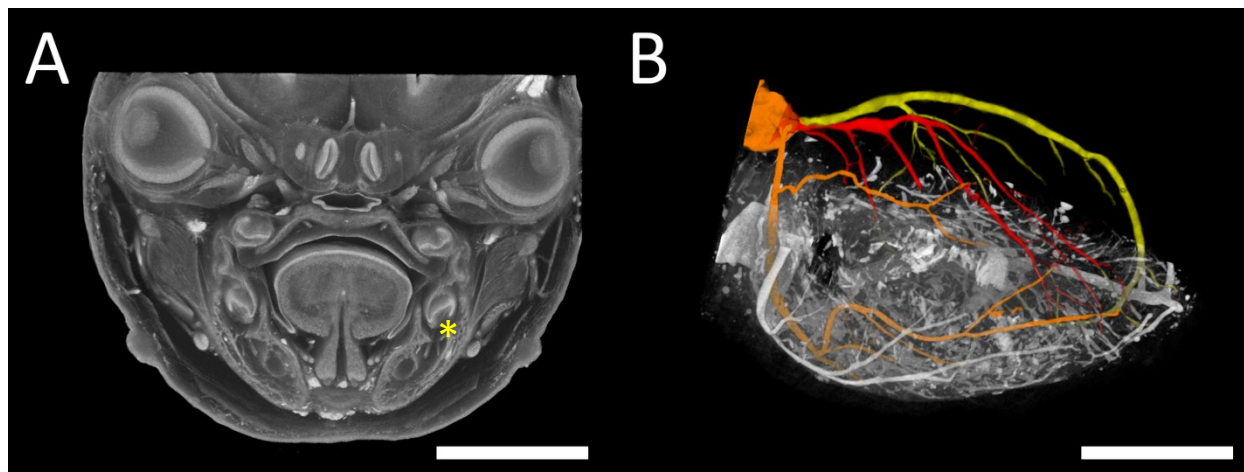
mikrometrů a u novějších systémů dosahuje hodnoty pod 1 μm (např. Bruker SkyScan 1272 0,35 μm). Skenovací čas se pohybuje většinou v rozmezí desítek minut až několika hodin a je určen velikostí vzorku, jeho charakterem a požadovaným rozlišením. Oproti *in-vivo* systémům jsou tyto většinou limitovanější velikostí vzorku, avšak existují i přístroje umožňující skenování vzorků o desítkách cm, které jsou spíše využívány v průmyslové aplikaci.

2.1.3 Proces skenování a zpracování dat

V této části budou uvedeny základní aspekty procesu skenování a zpracování získaných dat. Jednotlivé kroky přípravy a nastavení parametrů zásadně ovlivňují kvalitu dosažených výsledků. V závislosti na charakteru vzorku jej lze skenovat ve stavu suchém (volně nebo ve zkumavce) či vlhkém (např. ve vodě, etanolu, formolu). Software pro použití mikro-CT a následné zpracování dat je většinou zajištěn konkrétním výrobcem přístroje, avšak je možné využít i externí software (např. ImageJ; <http://imagej.nih.gov/ij>). Vzorky jsou fixovány na nosič a umístěny do skenovací komory přístroje. Zajištění fixace a stabilizace vzorku (např. „odstání“ či temperování vloženého biologického vzorku do zkumavky) je zdánlivě triviálním, avšak zcela zásadním krokem. Předchází se tak vzniku skenů, u nichž by byla v důsledku pohybových artefaktů získaná data zcela bezcenná. Kromě základních nosičů vzorků existují i speciální varianty, které umožňují skenovat vzorky při působení definovaného tlaku (v rámci mechanických kompresních testů; mechanical testing stage) či za určité teploty (cooling/heating stage).

Již z pilotních projekcí je patrná RTG denzita vzorku. Pokud není nativně přítomný kontrast dostatečný, je možné jej uměle doplnit či zesílit. V případě materiálových vzorků lze kontrast zvýšit přidáním složky s vyšší denzitou (např. nanočástice Ag v kompozitních tkáňových nosičích). U biologických vzorků mohou být použity nespecifické kontrastní látky, mezi které patří např. roztok fosfowolframové kyseliny či Lugolův roztok (viz obr. 3). Aplikace je nejčastěji provedena prostým ponořením vzorku do kontrastního roztoku na určitou dobu. Tyto metody shrnul ve své práci B. D. Metscher (Metscher B. D., 2009). Specifického kontrastování je možné dosáhnout použitím protilátek proti definované struktuře a následné aplikaci sekundární protilátky s enzymem, který redukuje RTG denzní částice (např. stříbro). Tato metoda byla s úspěchem použita k hodnocení exprese určitých genů v daném čase u embrya a umožnila tak nedestruktivní vyhodnocení celého embrya ve 3D (whole-mount imaging; Metscher B.D. a Muller G.B., 2011). Technická náročnost uvedeného postupu je samozřejmě výrazně vyšší než v předešlém případě. Další variantou je aplikace kontrastu intravaskulárně (nejčastěji technikou mikroinjektáže, viz obr. 3; Zagorchev et al., 2010; Ghanavati S. et al., 2014). V současné době existují komerčně dostupné standardizované přípravky modifikované pro mikro-CT aplikaci (např. Microfil, Flow

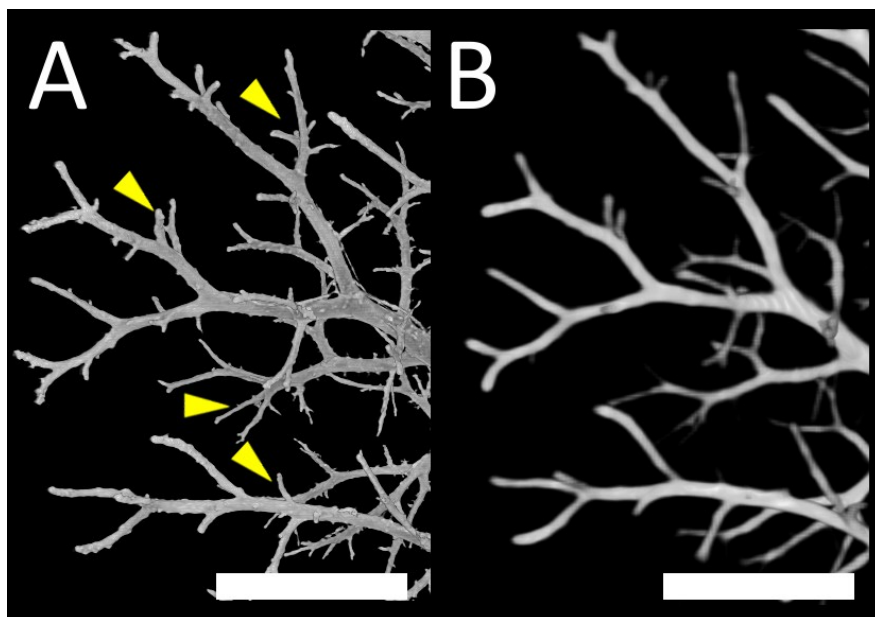
Tech Inc., USA), často s obsahem samopolymérující pryskyřice, která po ztuhnutí zajistí prostorovou stabilitu kontrastovaných struktur a je kompatibilní s fixačním roztokem.



Obr. 3: Ilustrace použití RTG kontrastních látek při mikro-CT skenování (vlastní data): A) hlava myšního embrya (ED 16), kontrastovaná pomocí fosfowolframové kyseliny (PTA); 3D vizualizace, kombinovaná s koronálním průřezem vzorkem; jsou velice dobře patrné tvrdé (kraniofaciální skelet) i měkké tkáně (kůže, svaly, cévy, mozek, oční bulby aj.); zárodky zubů jsou též zobrazeny (); B) vzorek myšního srdce s intravaskulárně aplikovanou kontrastní látkou (Microfil, Flow Tech Inc., USA), využitý k hodnocení anatomie koronárních arterií (snímek byl připraven v rámci projektu publikovaného v Kolesová et al., 2018). Měřítko: A = 1 mm, B = 2 mm.*

Základní parametry mikro-CT skenování

Mezi základní parametry mikro-CT skenu patří zvolená velikost pixelu (pixel size), jež následně odpovídá rozměru strany 3D rekonstruovaného isotropického voxelu (voxel size). Je určena rozlišením detektoru a geometrickým přiblížením (vzdálenost detektor – vzorek - zdroj záření). Nastavení velikosti pixelu je zásadní a mělo by být voleno na základě znalosti struktury vzorku či provedených pilotních skenů. Hodnota velikosti pixel size ovlivňuje dosažené rozlišení, avšak nemá stejnou hodnotu. Rozlišení souvisí s nejmenší vzdáleností dvou bodů, při kterém jsou tyto dva body detekovány jako samostatné, resp. s nejmenší velikostí objektu, který je detekován (Stock S.R., 2009). Příliš vysoké rozlišení (nízká hodnota pixel size) neovlivní negativně získaná data, ale časová i datová náročnost bude zbytečně vysoká, což povede ke snížení efektivity přístroje. Nedostatečné rozlišení může vést k nezachycení části struktury, což může zcela zásadně ovlivnit hodnocení zkoumaného vzorku. Kritické jsou v tomto ohledu zejména hierarchicky uspořádané struktury (např. porézní tkáňové nosiče) či větvící se struktury (např. cévní řečiště, mikro a nanovláknenné materiály; viz obr. 4; Pyka G. et al., 2014).



Obr. 4.: Vliv velikosti pixelu ($A = 4 \mu\text{m}$; $B = 16 \mu\text{m}$) na zobrazení větvičky se struktury (vlastní data, nástřík žlučovodů RTG kontrastním materiálem). Na snímku B je patrná absence detailů struktury. Některé chybějící oblasti jsou vyznačeny žlutou šipkou. Měřítko = 1 mm.

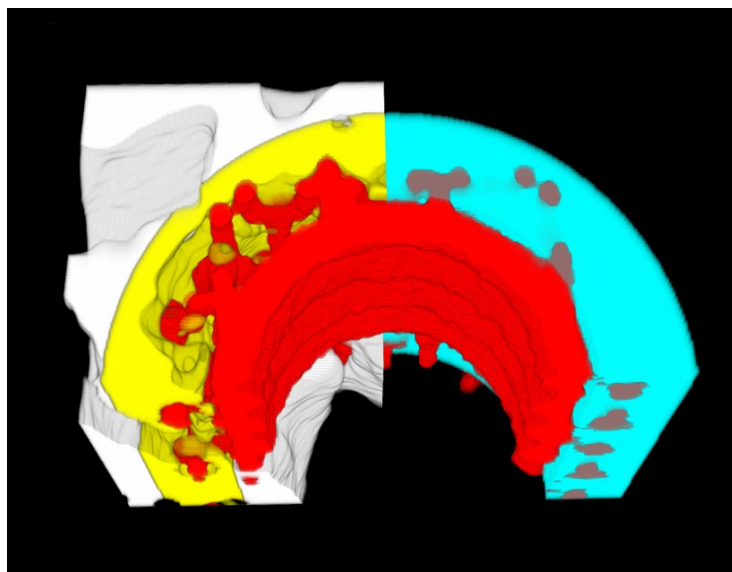
Významným parametrem je nastavení energie RTG záření, a to pomocí určení napětí rentgenky. U komerčně užívaných mikro-CT přístrojů je toto často automaticky spojeno s nastavením filtru, který limituje vstup záření pod určitou hodnotou energie. Vhodně zvolená energie záření zajišťuje dostatečnou prostupnost vzorkem (doporučovaná nejnižší prostupnost je 15-20 %). V případě, že vzorek je i při maximální energii záření neprostupný (tj. 0% prostupnost), pak je v rozsahu přítomnosti vysoce RTG denzní části nehodnotitelný. Využití filtru eliminuje záření o nižších energiích (část spektra, která filtrem neprojde) a tím mj. redukuje vznik beam hardening artefaktu (viz 4.4.2).

V průběhu skenování je vzorek postupně pravidelně rotován o celkem 180° nebo 360° . Druhá varianta obecně vede k vyšší kvalitě získaných dat (dataset obsahuje dvojnásobný počet projekčních snímků) a je výhodná zejména v případě výrazné RTG heterogenity vzorku (např. kovový implantát v kostní tkáni). 360° rotace pochopitelně znamená dvojnásobnou časovou i datovou náročnost, která ovlivňuje i jakékoliv další zpracování dat (rekonstrukce, vizualizace i analýzy). V každém rotačním kroku je pořízen jeden projekční snímek, který je vždy v různé míře ovlivněn obrazovým šumem. Lze předpokládat, že jeho distribuce je náhodná, a tedy na každém pořízeném snímku různá, zatímco signál skenovaného objektu zůstává stejný. Pomocí metody průměrování (frame averaging) je možné šum redukovat. Ve stejné pozici je zhotoven větší počet snímků, jejichž hodnoty jsou zprůměrovány za vzniku definitivní projekce, čímž je zlepšen poměr šumu k signálu (signal to noise ratio). Před samotným skenováním je také důležité provést kalibraci detekční kamery (flat-field correction), která umožňuje korigovat případný vliv rozdílné citlivosti jednotlivých sensorů kamery (Stock S.R., 2009).

Rekonstrukce projekčních snímků a jejich vizualizace

Dataset projekčních snímků (projection images) lze rekonstruovat do datasetu transversálních průřezových snímků (cross-section images). Dochází tím k převedení hodnoty atenuačního koeficientu (vyjádření míry absorpce RTG záření v daném bodě) na hodnotu stupňů šedi (grayscale value). Při rekonstrukci lze částečně kompenzovat některé CT obrazové artefakty, mezi které řadíme např. kruhové artefakty (ring artifact), misalignment a beam hardening (většinou užívané bez českého ekvivalentu). Dataset průřezových snímků je tvořen z jednotlivých průřezů kolmých na z osu. „Tloušťka“ každého řezu odpovídá rozměru voxelu.

Rekonstruovaná data je možné vizualizovat ve 2D i ve 3D. 2D vizualizace představují virtuální průřezy, které mohou být nejen ve třech základních na sebe kolmých rovinách (koronální, sagitální, transversální), ale i v libovolně orientovaných řezech. 3D vizualizace je možná na základě dvou odlišných postupů. Prvním je volume rendering (zobrazení voxelů v závislosti na hodnotě stupňů šedi (grayscale value), kterému jsou ve vizualizačním programu přiřazeny vlastnosti jako např. transparence, světelnost, barva). Druhou možností je surface rendering (zobrazení povrchu objektu po jeho softwarovém vygenerování). Obrazová data je možné modifikovat, upravovat a segmentovat (vybírat), čímž lze dosáhnout odlišení jednotlivých částí vzorku (např. oddělení kostní tkáně, augmentačního materiálu a implantátu; viz obr. 5).

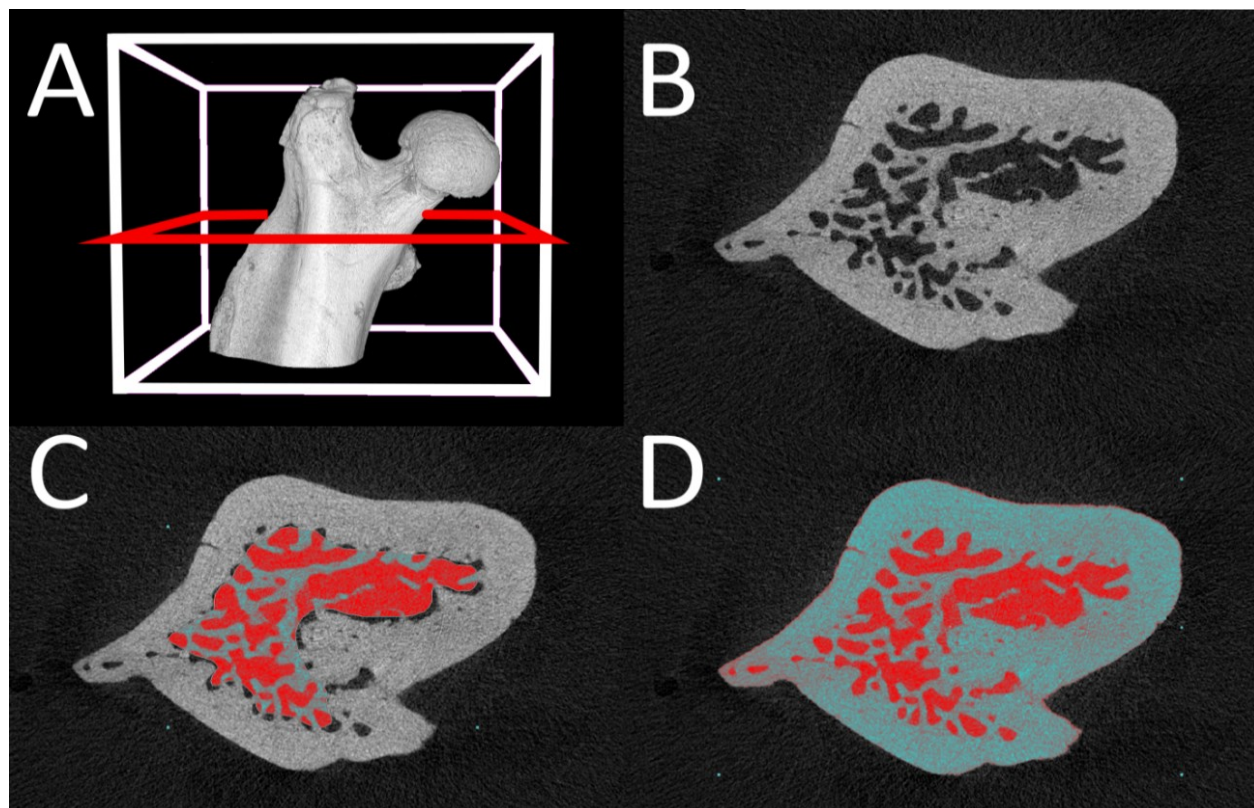


Obr. 5: Vizualizace osseointegrovaného 3D tištěného titanového implantátu (vlastní data), který byl implantován do prasečího proximálního femuru. Barevné kódování: červená – titanový implantát; tyrkysová – oblast zájmu (vymezena okrajem původní preparované štoly a vnějším povrchem implantátu), ve které je hodnocena novotvořená kost; bílá – kostní tkáň; žlutá – kostní tkáň uvnitř oblasti zájmu (novotvořená kostní tkáň).

2.1.4 Analýza obrazových dat

Základní pojmy a principy

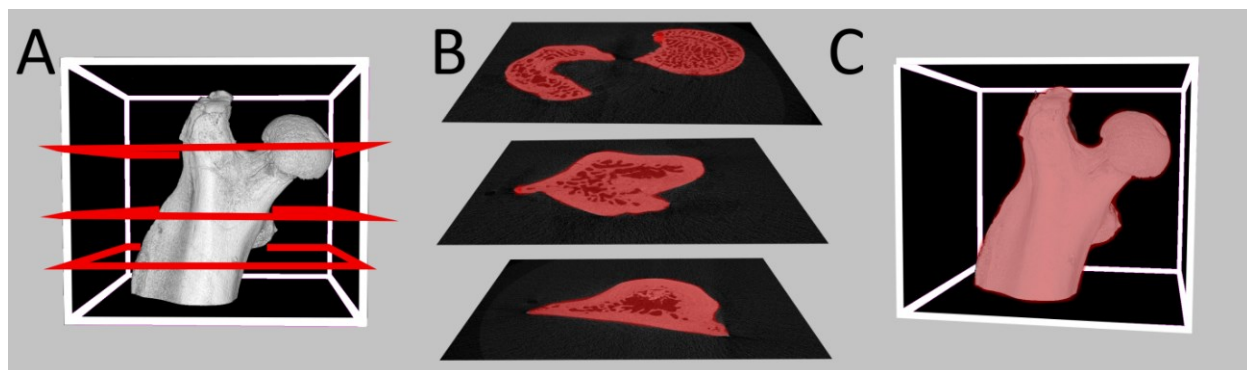
Základem mikro-CT analýzy je kvantifikace určitých strukturních parametrů zkoumaného vzorku. Před většinou výpočetních operací je nezbytné dataset binarizovat, tedy převést stupně šedi do černobílého obrazu, kdy dojde k jednoznačnému rozdělení na objekt (bílá) a pozadí (černá). Jako základní výchozí hodnota slouží celkový objem (Total Volume, TV), který odpovídá celému objemu analyzovaného datasetu. Velice často je však potřeba analyzovat jen určitou oblast uvnitř celkového objemu. Takto vymezená oblast ve 2D (tedy v řezu) je tzv. oblast zájmu (Region of Interest, ROI; viz obr. 6).



Obr. 6: Ilustrace základních parametrů a výběru oblasti zájmu (region of interest, ROI; vlastní data): A) 3D zobrazení kostního vzorku; bílá krychle představuje celkový objem (TV – total volume); objem vzorku představuje object volume (Obj.V.); rovina vymezena červeně znázorňuje místo průřezu vzorkem, které je na následujících snímcích; B) 2D průřez vzorkem kostní tkáně; C) znázornění výběru oblasti zájmu (červeně) zaměřené na trámčitou kost; D) výběr ROI zahrnující kostní tkáň jako celek.

Pokud je ROI určen ve více úrovních datasetu, pak definuje 3D prostor, který se nazývá Volume of Interest (VOI; viz obr. 7). ROI může být definováno např. geometrickým objektem (např. krychle, válec) nebo komplexní 3D strukturou (např. rozsah kortikální kosti). Správný výběr ROI je zcela klíčový

a náchylný k chybovosti. Jako příklad lze uvést hodnocení kostní tkáně (např. vzorek diafýzy), kdy je nezbytné, aby pro správný výpočet byla veškerá kostní tkáň vzata do ROI. Pokud $ROI = TV$, pak veškeré relativní parametry budou zkreslené. Pokud bude výběr ROI chybně zasahovat vně či mimo kostní tkáň, dosažený výsledek bude popisovat něco jiného, než jsme požadovali (Landis E.N. a Keane D.T., 2010).



Obr. 7.: Ilustrace oblastí zájmu (vlastní data), výběru ROI (region of interest) a vytvoření VOI (volume of interest): A) 3D zobrazení kostního vzorku, červeně jsou naznačeny různé úrovně, ve kterých byl pro ilustraci zhotoven průřezový snímek; B) průřezové snímky s červeně vymezenou oblastí zájmu (ROI), která zahrnuje veškerou kostní tkáň; C) v případě výběru ROI v celém datasetu je jejich vzájemným propojením vytvořena 3D oblast zájmu – VOI.

Strukturní parametry a jejich význam

Morfometrická analýza může být provedena ve 3D (přímé měření 3D modelu objektu) i 2D (hodnocení na základě jednotlivých průřezových snímků). Objekty, které jsou v rámci VOI, je možné analyzovat jako celek (integrated analysis), nebo stanovit určené parametry pro každý samostatný (diskrétní) objekt, přítomný ve VOI (individual object analysis). Kombinace výše uvedených postupů vede ke čtyřem základním typům analýzy (viz tab.1; Bruker micro-CT), přičemž nejčastěji jsou preferovány 3D varianty.

Tab. 1: Typy mikro-CT analýzy

	3D	2D
Integrovaná analýza (Integrated analysis)	<ul style="list-style-type: none"> • hodnocení objektů v analyzovaném datasetu jako celku • např. celkový objem, procentuální objem, celkový povrch, porozita, počet objektů, tloušťka struktury • výpočet na 3D modelu objektu 	<ul style="list-style-type: none"> • hodnocení objektu v analyzovaném datasetu jako celku • např. celkový objem, procentuální objem, celkový povrch, porozita, počet objektů, průměrná hodnota obvodu objektu či ROI • výpočet v každém řezu samostatně a následný výpočet 2D i 3D hodnot
Analýza jednotlivých objektů (Individual object analysis)	<ul style="list-style-type: none"> • hodnocení stanovených parametrů pro každý samostatný objekt • např. objem, povrch, porozita, tloušťka, průměr/povrch objemově ekvivalentní koule • výpočet na 3D modelu objektu 	<ul style="list-style-type: none"> • hodnocení stanovených parametrů pro každý samostatný objekt • např. obvod, povrch, průměr, tvar, průměr kruhu o ekvivalentním povrchu, průměrná tloušťka • výpočet každého samostatného objektu ve vybraném řezu samostatně

Mikro-CT umožňuje výpočet uvedených parametrů na základě virtuálního 3D modelu objektu. Hodnoty jsou tedy nezávislé na orientaci vzorku, což představuje významnou výhodou oproti konvenčnímu hodnocení 3D struktury vzorků na základě průřezů (např. při histologii), které poskytují pouze 2D informaci a musí být převáděny na 3D hodnoty, čímž dochází k možnému vzniku nepřesností. Konvenční postup je destruktivní, časově náročný, pracný a je ovlivněn orientací vzorku (protože typický biologický vzorek není izotropní).

Množství mikro-CT hodnotitelných strukturních parametrů je značné. Tabulka 2 uvádí příklad vybraných parametrů včetně jejich popisu a možného významu. Mezi „základní“ parametry řadíme např. různé typy objemů, povrchů a jejich vzájemných poměrů a dále porozitu. Jako „pokročilé“ lze uvést tloušťku struktury (viz str. 27), či stereologické parametry, například isotropii a konektivitu. Vyhodnocené parametry mohou být absolutní i relativní (například objem objektu a procentuální objem objektu, který je vztažen k objemu analyzovaného datasetu).

Tab. 2: Příklady vybraných strukturních parametrů a možnost využití

Parametr		Vysvětlení	Příklady využití
Objem	Total Volume (TV)	Objem analyzovaného datasetu	<ul style="list-style-type: none"> Referenční objem
	Object volume (Obj.V.)	Objem objektu	<ul style="list-style-type: none"> Objem novotvořené kostní tkáně v místě defektu Objem implantátu Objem odstraněného dentinu při endodontickém ošetření
	Percent Object Volume	Obj.V. / TV	
Povrch	Object Surface	Povrch objektu	<ul style="list-style-type: none"> Povrch implantátu Změna povrchu při degradaci a fragmentaci materiálu
	Intersection Surface	Plocha kontaktu mezi objektem a hranicí oblasti zájmu (VOI)	<ul style="list-style-type: none"> Výpočet bone to implant contact (BIC), kdy povrch implantátu je uvažován jako VOI a kostní tkáň jako objekt
	Object Surface Density	Vyjádření povrchů ve vztahu k VOI	<ul style="list-style-type: none"> Porovnání, který typ tkáňového nosiče nabízí větší povrch k interakci
Porozita	Open porosity	Otevřený pór komunikuje s okolním prostředím	<ul style="list-style-type: none"> Objem pórů biomateriálu, který komunikuje s okolním prostředím a může být kolonizován buňkami
	Closed porosity	Uzavřený pór nekomunikuje s okolním prostředím	<ul style="list-style-type: none"> Objem pórů biomateriálu, který nekomunikuje s okolním prostředím a jeho biologický význam může být limitovaný
	Total porosity	Celková porozita materiálu (otevřená i uzavřená)	<ul style="list-style-type: none"> Porovnání a výběr vhodného tkáňového nosiče dle jeho porozity
Počet objektů	Number of Object	Počet objektů	<ul style="list-style-type: none"> Detekce fragmentace objektu (např. rozpad biodegradabilní slitiny)

Anisotropie	Degree of Anisotropy	Vyjádření preferenčního uspořádání (orientace) struktury	<ul style="list-style-type: none"> • Popis změny uspořádání kostní tkáně v průběhu hojení • Popis isotropie tkáňových nosičů, která mj. souvisí s mechanickými vlastnostmi
Structure Thickness		Tloušťka struktury	<ul style="list-style-type: none"> • Porovnání vzorků kostní tkáně • Charakterizace vláken materiálů • Charakterizace velikosti částic augmentačního materiálu
Structure Separation		Tloušťka prostoru mezi objekty/částmi objektu (tzn. porozity)	<ul style="list-style-type: none"> • Charakterizace velikosti pórů • Hodnocení lomné linie materiálu

Mikro-CT je často využíváno za účelem hodnocení porozity vzorku. Porozita odpovídá dutinám uvnitř materiálu a významně ovlivňuje jeho vlastnosti, např. mechanické (pevnost, tuhost aj.), chemické (degradace) i biologické (reakce s okolní tkání, proliferace a diferenciací buněk, vaskularizace aj.). Porozita sestává z pórů, které mohou být izolované nebo spolu mohou vzájemně komunikovat. Pór může být otevřený, kdy komunikuje s povrchem vzorku, resp. se zevním prostředím, či uzavřený (bez uvedené komunikace). Toto rozdělení vytváří kategorie porozity, a to otevřené, uzavřené a celkové. Parametry uzavřené porozity se vztahují k objemu materiálu, uvnitř kterého póry jsou, kdežto otevřená porozita se vztahuje k celkovému objemu zájmu (VOI), proto procentuální hodnoty součtu otevřené a uzavřené porozity neodpovídají procentuální hodnotě celkové porozity. Významné je také propojení pórů mezi sebou (interkonektivita), které má kritický význam např. na permeabilitu, difuzi živin, migraci buněk či vaskularizaci a celkovou biokompatibilitu materiálu. Kromě stanovení porozity je důležitý jejich tvar, orientace a velikost (Schladitz K., 2011).

Významný a často hodnocený parametr představuje Structure Thickness (tloušťka struktury) a komplementární parametr Structure Separation (vzdálenost mezi částmi struktury či tloušťka pórů). Určení jejich hodnot je založeno na sphere-fitting algoritmu, kdy je vypočítána 3D osa daného objektu. Z ní jsou následně expandovány virtuální koule, které prostor hodnoceného objektu za určitých podmínek zcela vyplní. Tím je každá objemová jednotka objektu přiřazena do některé z těchto koulí s již definovanými parametry (průměr apod.). Mikro-CT umožňuje získat informaci o průměrné tloušťce v rámci struktury a též o její distribuci (Structure Thickness Distribution), která prezentuje podíl objemu objektu v určitém intervalu hodnot Structure Thickness (Hildebrand T., Rüeggsegger P., 1997; Rémy É., Thiel É., 2002).

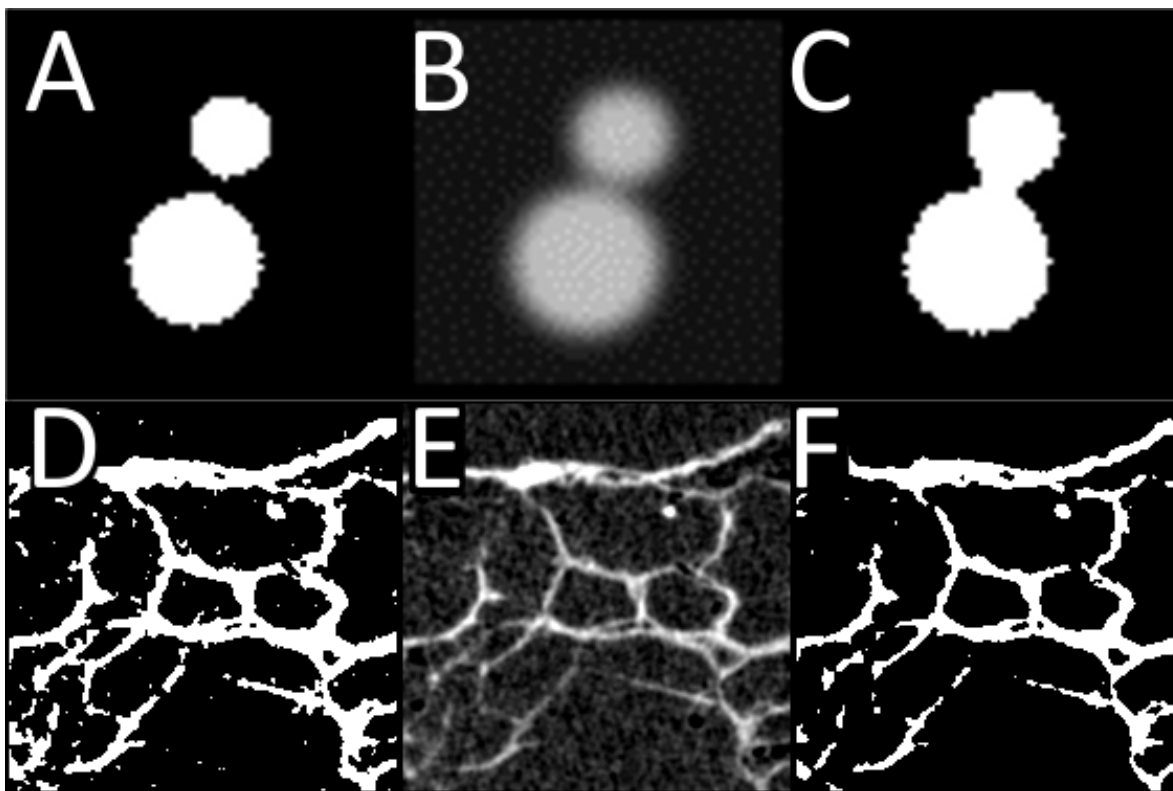
Jako významný parametr při popisu kostní tkáně se uváděla hodnota SMI (Structure Model Index; Hildebrand T1, Rüegsegger P., 1997). Tento parametr byl použit v mnoha studiích (např. Ding M. a Hvid I., 2000). Jeho cílem bylo popsat preferenční uspořádání kostní tkáně v rámci polarit plate-like a rod-like structure (trámčitá - plátovitá). Ukázalo se však, že výpočet tohoto parametru nereflektuje dostatečně geometrické uspořádání kosti a od jeho užívání by mělo být ustoupeno (Salmon P., 2015).

Modifikace dat před analýzou

Obrazová data získaná rekonstrukcí většinou nejsou přímo využitelná ke kvantifikaci. Důvodem může být přítomnost artefaktů, obrazového šumu, objektů, které nejsou předmětem zájmu, potřeba segmentace obrazu (výběr jen určité části), určení oblasti zájmu, nutnost binarizace apod. Vliv všech uvedených operací na dosažené výsledky analýzy je nesporně velice významný. Chyba, která je tímto procesem způsobena, je obecně obtížně kvantifikovatelná.

Před analýzou většiny parametrů musí být data binarizována. Hodnoty stupňů šedi jsou převedeny do černobílé sestavy, čímž dojde k jednoznačnému rozdělení na objekt (bílá) a pozadí (černá). Tento krok představuje kritickou část zpracování dat. Složitost tohoto procesu značně závisí na typu vzorku, kdy binarizace např. kostní tkáně je obecně jednodušší než kompozitního tkáňového nosiče. S tím souvisí i citlivost dat k chybám vlivem nevhodné binarizace.

Přechod mezi objektem a pozadím je vždy plynulý, takže je otázkou, kde přesně by měla tato hranice být umístěna (viz obr. 8). Při odlišných postupech binarizace bude objekt zvětšen, resp. zmenšen, což ovlivní všechny relevantní parametry. Pokud uvážíme dva samostatné objekty v těsné blízkosti, při určitém nastavení binarizace dojde k jejich spojení, což znamená významné ovlivnění strukturních parametrů (počet objektů, objem, povrch aj.). Pokud uvážíme tenkou strukturu (např. stěna tkáňového nosiče), jejíž denzita je nehomogenní (např. v důsledku partial volume effect – viz 4.4.2), pak při určitém nastavení binarizace dojde k vytvoření defektu struktury, což opět významně ovlivní strukturní parametry (např. velikost a spojení pórů). V reálné situaci jsou všechny tyto vlivy kombinovány současně, a to navíc s různými CT artefakty a obrazovým šumem.

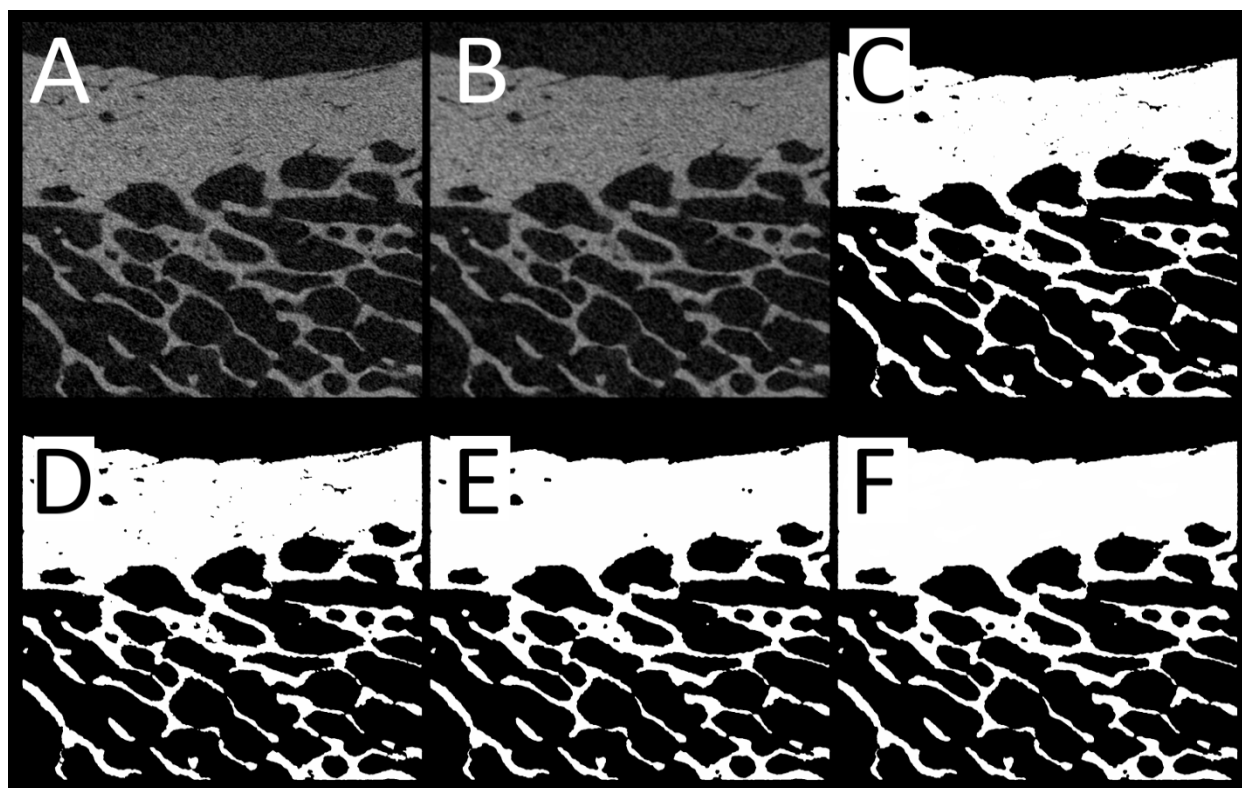


Obr. 8.: Ilustrace problematičnosti binarizace (vlastní data): A, B, C) Virtuální objekty vytvořené programem TelGen (Jiřík M., Bartoš M. et al., 2018); B) původní snímek ve stupních šedi; je patrný postupný přechod pozadí-objekt a vliv simulovaného obrazového šumu nízké intenzity; oba objekty se jeví jako samostatné; A, C) stejný snímek binarizovaný různými postupy, čímž je dosaženo významně rozdílných výsledků, kdy v A jsou objekty samostatné a C spojené; okraje objektů jsou vlivem šumu nepravidelné; D, E, F) snímky hydratovaného kompozitního tkáňového nosiče, jež představuje komplikovanou situaci pro hodnocení; data jsou nativní, bez jakýchkoliv úprav či korekcí; E) původní snímek ve stupních šedi, D a F různé varianty binarizace; je patrný rozdíl ve struktuře objektu a míře obrazového šumu.

S ohledem na charakter vzorků se metoda binarizace liší. V případě hodnocení omezeného množství velice variabilních vzorků (typicky v biologické oblasti aplikace) je často užíváno individuální/manuální určení způsobu binarizace. V případě hodnocení většího souboru podobných vzorků (typické pro technické vědy) bývá preferována automatická binarizace, která zajišťuje srovnatelnost výsledků 3D analýzy u různých vzorků. Jako základní a nejjednodušší metodu binarizace lze uvést global threshold, při kterém se stanoví prahová hodnota stupně šedi (grayscale value); všechny pixely/voxely nad/pod touto hodnotou jsou převedeny na černou, resp. bílou. Na obr. 8 je patrný zásadní vliv binarizace na charakter

hodnocených dat. Komplikovanějším postupem jsou různé varianty adaptive threshold, kdy se při binarizaci více uplatňuje vliv okolí daného pixelu/voxelu.

Obrazová data lze rozsáhle modifikovat (více v části 3 - Metodika). Mezi základní operace patří redukce obrazového šumu („denoising operations“, např. „filtration“ či „despeckle“), který je přítomen v různé míře v každém naskenovaném datasetu. Morfologické operace umožňují zvětšit/zmenšit objekty ve 2D i 3D, a tak např. ovlivňovat jejich vzájemné spojení (erosion/dilatation/closing/opening procedure). Pomocí binárních operací lze pracovat s paralelním datasetem (např. tvořený ROI/VOI), jejichž odpovídající data mohou být navzájem sčítána, odečítána, atd. pomocí logických operátorů (AND, NOT, SUB aj.; např. příkaz: `image = image SUB region of interest` znamená, že ve finálním obrazu bude od současného obrazu odečtena struktura ROI; nebo `image = NOT image` znamená, že finální obraz bude negativ současného obrazu).



Obr. 9: Příklad modifikace obrazových dat (popis viz část 3 - Metodika) před analýzou kostní tkáně (vlastní data; převzato z Kubíková T., 2018): A) původní snímek ve stupních šedi, patrný obrazový šum nízké intenzity; B) redukce šumu filtrací obrazu nízké intenzity; C) binarizovaný snímek; D) odstranění objektů s objemem menším než 10 voxelů (pravděpodobně binarizované šumové pixely/voxely); E) uzavření otevřených pórů (morfologická operace – closing procedure), které by znemožnily výpočet tloušťky kortikální kosti; F) výsledný binarizovaný snímek.

2.2 Mikro-CT hodnocení tkáňových nosičů pro kostní regeneraci

2.2.1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství (Tissue Engineering - TE) představuje moderní koncept regenerativní medicíny, jehož cílem je nahradit či obnovit tkáň pacienta, jejichž struktura a funkce je nedostatečná. Důvodem může být např. poranění, nádorová a degenerativní onemocnění, vrozené vady či atrofie. Rozvoj TE byl stimulován doposud neuspokojivými terapeutickými možnostmi a jejich limitacemi u řady tkáňových defektů. Jako příklady lze uvést: kritický kostní defekt, osteochondrální poškození, kožní defekty, poškození či degenerace nervového systému, infarkt myokardu. TE potenciálně představuje alternativu ke konvenční terapii, například orgánové transplantaci se všemi jejími důsledky. Předností TE by měl být kontrolovatelný, predikovatelný a stabilní výsledek s minimálním zatížením pacienta (Wolfová L. et al., 2015; Vacanti J. P. a Langer R., 1999).

Dosavadní klinické úspěchy TE jsou však pozadu za původními očekáváními. Většina studií a poznatků zůstává na preklinické úrovni, navíc často s kontroverzními výsledky. Přetrvává nedostatek klinických studií (zejména randomizovaných klinických studií – RCT (randomized control trial)) a řada nepublikovaných výsledků (Ho-Shui-Ling A. et al., 2018; Tang D. et al., 2016).

Základní tři složky tkáňového inženýrství (tzv. triangular concept) představuje:

- **tkáňový nosič**, který slouží jako opora, „lešení“ (tzv. scaffold) a matrice pro novotvořenou tkáň, simulující extracelulární matrix;
- **buňky**, které mohou být různým způsobem a v různé míře diferencované (např. MSC - mesenchymal stem cells);
- **signální molekuly**, které ovlivňují chování buněk a okolní tkáň (typickým příkladem jsou růstové faktory).

Do tohoto „trojúhelníkového“ schématu byl v roce 2007 Giannoudisem přidán další bod (mechanické parametry a stabilita), kterým vzniká tzv. diamantový koncept (Giannoudis P. V. et al., 2007).

Následující text bude zaměřen na kostní tkáňové inženýrství, a to zejména s ohledem na orofaciální oblast.

2.2.2 Tkáňové nosiče – scaffoldy

Využití scaffoldů a jejich vlastnosti

Zjednodušeně lze říci, že v rámci TE plní tkáňové nosiče funkci extracelulární matrix. Cílem jejich použití je zajištění vhodného prostředí pro procesy hojení, resp. regenerace. Významně se podílí na uspořádání a organizaci novotvořené tkáně. V souladu s biomimetickými principy TE scaffoldy většinou strukturálně a materiálově kopírují nahrazovanou tkáň. V některých případech tak obsahují části s určitým uspořádáním (např. u léčby osteochondrálního defektu část nosiče odpovídá kosti, část chrupavce). Další funkcí scaffoldů může být řízené uvolňování biologicky aktivních látek (např. růstové faktory BMP v rámci konceptu growth-factor based tissue engineering; Lee K. et al., 2011) či léků (například antibiotik k prevenci infekcí a vzniku osteomyelitid (Mouriño V. a Boccaccini A.R., 2010; Garg T. et al., 2012)).

Základními požadavky na tkáňové nosiče jsou biokompatibilita, vhodná prostorová struktura, adekvátní mechanické a chemické vlastnosti. Dále je významná snadná manipulace s materiálem a jeho klinická aplikace, sterilizovatelnost, příznivá cena, rychlá, jednoduchá a spolehlivá příprava. Protože se většinou jedná o biodegradovatelné materiály, kinetika jejich degradace musí časoprostorově odpovídat procesům hojení (resp. regenerace) v místě defektu. Pokud bude degradace rychlejší, novotvořená tkáň ztratí oporu a organizační matici, pokud bude pomalejší, scaffold bude blokovat vstup tkáně do defektu. V průběhu degradace nesmí být uvolňovány látky s nežádoucími účinky (Hutmacher D., 2000; Bose S. et al., 2012).

Využívané materiály

Mezi materiály používané pro konstrukci tkáňových nosičů patří přírodní a syntetické polymery (kolagen, chitosan, kyselina hyaluronová, polylaktid, polyglykol, polykaprolakton aj.), biokeramika (různé druhy kalcium fosfátů (CaP), zejména hydroxyapatit (HAP), trikalcium fosfát (TCP), bifázické kalciumfosfáty (BCP), bioaktivní skla a jejich kombinace ve formě kompozitních materiálů a dále kovy a jejich slitiny (např. titan, hořčík aj.). Přírodní polymery mají obecně lepší biokompatibilitu než polymery syntetické, mohou však vyvolávat reakce imunitního systému a jejich vlastnosti nejsou zcela dobře kontrolovatelné. Syntetické polymery lze řízeně připravovat, snadněji chemicky modifikovat, a tím měnit jejich fyzikální i chemické vlastnosti. Jejich nevýhodou mohou být toxické degradační produkty. Časté jsou kombinace polymerů s částicovými materiály (mikro a nanočástice), tedy kompozitní materiály, např. s obsahem kalcium fosfátů či bioaktivních skel (Roseti L., 2017; Wolfová L. et al., 2015).

3D struktura

Prostorové uspořádání tkáňových nosičů má významný vliv na jejich funkci. Zásadním parametrem kostních scaffoldů je porozita. Představuje prostor, který může být osídlen buňkami, a to jak laboratorně při cell-seeding procesu, tak po implantaci buňkami z okolí. Velikost a tvar pórů má mj. vliv na buněčnou migraci, diferenciaci a vaskularizaci (Reilly 2010). Stěny dostupných pórů (tj. otevřená porozita) poskytují volný povrch, kde mohou buňky adherovat a interagovat s jeho strukturou (Peyrin F., 2011). Vnitřní uspořádání ovlivňuje též transport tekutin, který souvisí s difúzí živin a produktů metabolismu buněk nebo degradačních produktů. V případě, že je nosič před implantací či testováním osazován buňkami (cell-seeding) s cílem zvýšit jeho účinnost, má struktura a permeabilita vliv i na tento proces. Distribuce velikosti pórů může být variabilní a souvisí s metodou přípravy, kdy různé postupy umožňují různou míru kontroly (viz odstavec níže). V mnoha studiích je preferována heterogenní velikost pórů, tedy kombinace makro i mikroporozity (Woodard J. R., 2007). Jako zásadní se jeví vysoký podíl otevřené porozity a dostatečná míra propojení mezi póry (interkonektivita; Jones A.C. et al., 2009; Silva et al., 2006). V posledních letech narůstá výzkum vlivu nanostruktury (1-100 nm) scaffoldů na kolonizaci buňkami. Základem je hodnocení vlivu nanotopografie povrchu materiálů připravených běžnými způsoby (např. elektrostatickým zvlákňováním nebo lyofilizací). Dalším postupem je cílená modifikace vzorků přidáním nanostrukturních komponent (nanočástice, nanovlákná), které mohou významně měnit vlastnosti výsledného materiálu.

Příprava scaffoldů - vztah k 3D struktuře

Pro přípravu tkáňových nosičů může být použita celá řada postupů. Někteří autoři je zjednodušeně dělí na dvě základní skupiny – konvenční (conventional) a aditivní metody (3D tisk; Roseti L., 2017). Při tomto rozdělení lze mezi konvenční postupy zařadit formování z disperze (solvent casting and particulate leaching), řízené napěňování (gas foaming), lyofilizaci (vakuové vymrazování), fázovou separaci nebo odstředivé či elektrostatické zvlákňování, případně jejich kombinace. Mimo zvlákňování, při kterém jsou z polymeru převedeného do roztoku nebo disperze připravována vlákna působením odstředivé nebo elektrostatické síly, jsou ostatní metody v principu založené na použití porogenu, jenž vytváří v prekurzoru scaffoldu požadovanou porozitu a následně je z něj odstraněn. Jako příklad lze uvést sublimaci ledu při lyofilizaci nebo rozpouštění solí uvnitř nerozpustného materiálu (solvent casting). Tyto postupy jsou technicky jednoduché a levné, velikost pórů a míru porozity lze řídit jednoduchými procesními parametry, jako například teplotou či rychlostí zamražení nebo objemem tekutiny v případě lyofilizací. Avšak kontrola výsledné prostorové struktury může být omezená (např. tvar a prostorové uspořádání pórů, jejich orientace a vzájemné propojení). Navíc v případě nutnosti rozpouštění určité

složky mohou ve struktuře zůstat zbytky nerozpuštěného materiálu nebo rozpouštědla (Thavornnyutikarn B. et al., 2014).

Rozvoj možností při tvorbě materiálů s definovanou vnitřní porozitou přinesly aditivní technologie (rapid prototyping, 3D tisk), vyvíjené od osmdesátých let 20. století původně především pro rychlou tvorbu prototypů a modelů (Bose S. et al., 2013). V průběhu let se prosadilo hned několik technologií, které pracují na principu modelování pomocí postupného přidávání nebo vytvrzování vrstev materiálu. Nejstarší technologií je stereolitografie, při které je model vytvářen postupným vytvrzováním plastických hmot citlivých na světlo (fotopolymer). Dalšími zástupci prototypingu jsou spékání laserovým paprskem (Selective Laser Sintering), tisk pomocí tenkého vlákna (Fused Deposition Modelling) nebo tisk pomocí jedné a více tiskových hlav. Podobně jako v technických oblastech je i při přípravě scaffoldu 3D tiskem základem virtuální model, který je připraven v počítačovém programu (CAD - computer aided design). Strukturní parametry jsou tedy dobře definovány. Požadovaná struktura může být získána na základě informací o reálném objektu, které byly získány zobrazovacími metodami (CT, MRI, mikro-CT). Další variantou je získání prostorových parametrů na základě biomatematických modelací, kdy je výchozí návrh optimalizován pomocí simulace zatížení, průtoku tekutin, degradace, migrace buněk apod. (Gómez S., 2013). Výhodou 3D tisku je vysoká míra kontroly výsledné struktury, její reprodukovatelnost a rychlost tisku. S výhodou bude aplikován v případě komplikovaných nosičů obsahujících oblasti o různé struktuře (např. chrupavka-kortikální kost-trámčitá kost). Materiálem pro 3D tisk může být široké spektrum materiálů od polymerů (PLA, PCL) po kovy (Ti6Al4V) nebo biologické materiály, přičemž každý materiál má specifické postupy přípravy. Nejpokročilejší metodou se nyní jeví bioprinting, který umožňuje tištění biomateriálů již v kombinaci s buňkami (Mandrycky Ch., 2016). 3D tisk má samozřejmě také nevýhody, mezi které patří zatím horší mechanické vlastnosti tištěných materiálů ve srovnání s konvenčními, obtížně řiditelná povrchová porozita nebo, alespoň prozatím, vyšší náklady.

2.2.3 Význam buněk a signálních molekul v tkáňovém inženýrství

Buňky

Postupy TE zahrnují i aplikaci buněk, a to samostatně nebo v kombinaci s tkáňovými nosiči. Základním postupem je izolace buněk, charakterizace a jejich proliferace. Buňky mohou být autologní, alogenní či xenogenní. První uvedené se jeví jako nejperspektivnější s ohledem na cytokompatibilitu. Cílem těchto postupů je získání buněk, které produkují extracelulární matrix dané tkáně, zajišťují jejich funkce a zároveň jsou auto- i para-křinně aktivní a tedy ovlivňují okolní buněčné populace (Tollemar V. et al., 2015; Wolfová L. et al., 2015). K tomuto účelu jsou užívány nediferencované buňky (např. MSC), které

mají široký diferenciální potenciál a schopnost sebeobnovy v důsledku schopnosti asymetrické mitózy. Pro účely TE jsou obecně užívány adultní kmenové buňky. Stále častěji je využíváno dediferenčních postupů u již specializovaných buněčných typů (iPSC – induced pluripotent stem cells). Následně jsou tyto buňky kultivovány v bioreaktorech, pomocí určitých signálních postupů (např. užití růstových faktorů) diferencovány do požadovaných typů a poté osazeny na tkáňové nosiče, které jsou implantovány do tkáňového defektu (Wolfová L. et al., 2015). Významným faktorem, který ovlivňuje diferenciaci buněk, je struktura tkáňových nosičů (na makro-, mikro- i nano-úrovni) a její mechanické vlastnosti (Alves N.M. et al., 2010; Abagnale G. et al., 2015).

V případě kostního TE je základním cílem dosáhnout diferenciace buněk do osteoblastů, avšak další buněčné typy, zejména endotelie, jsou nezbytným předpokladem úspěšného hojení. Jako možný zdroj vhodných buněk bylo studováno mnoho tkání (kostní dřevina, periost, tuková tkáň, sval, zubní dřevina aj.). V rámci pokusů bylo v řadě studií *in-vitro* za určitých podmínek pozorováno úspěšné dosažení osteogenní diferenciace. Při přenosu poznatků do *in-vivo* animálních studií byla v řadě studií, týkajících se posouzení osteogenního potenciálu, pozorována podpora osifikace kostního defektu (ortotopický model), případně osifikace jiné než kostní tkáně (heterotopický model) (Tollemar V. et al., 2015; Meijer G.J., 2007).

Veliká očekávání, která s aplikací kmenových buněk byla spojena, se doposud nenaplnila. Představa, že aplikace kmenových buněk a nosiče do poškozené tkáně bude spolehlivým řešením byla lichá. Naprostá většina studií se týká pouze *in-vitro*, případně *in-vivo* preklinických experimentů. Obecně jsou dosavadní výsledky spíše kontroverzní (Ho-Shui-Ling A. et al., 2018). Do fáze klinických experimentů se dostalo jen malé množství studií a mnoho z nich skončilo bez publikovaných výsledků. Jediná oblast se suverénní úspěšnou klinickou aplikací představuje transplantace hematopoetických buněk. Významný vedlejší produkt studia kmenových buněk představuje zlepšení poznatků buněčné biologie a uvedení konceptu nádorové kmenové buňky (Yu Z. et al., 2012). Situaci kolem MSC v tkáňovém inženýrství dokresluje posledních dvacet pět let výzkumu průkopníka jejich použití pana Arnolda I. Caplana. Na začátku 90. let 20. století se teorie o neomezeném regeneračním potenciálu MSC stala světově uznávanou a byl započat dodnes běžící výzkumný směr (Caplan A., 1991). V průběhu následujících skoro dvaceti let proběhly statisíce výzkumů a tisíce klinických studií, které se snažily objasnit, jak jsou MSC schopny zajistit regeneraci tkání. Odpovědi jsou dvě – buď se MSC přemění na buňky poškozené tkáně, nebo jsou bohatým zdrojem molekul a látek, které v místě poškození zajistí opravu tkáně – například zajistí množení se poškozených buněk, nebo jim pomohou vytvořit novou mezibuněčnou hmotu, nebo pomohou diferenciaci kmenových buněk poškozeného orgánu. Současné poznatky se přiklání spíše ke druhé

variantě, jak dokládá i sám A. Caplan v publikaci, která se zasazuje o změnu názvu těchto buněk, se zachováním zaběhnuté zkratky MSC, na Medicinal Signaling Cells (Caplan A., 2017).

Signální molekuly

Jedná se o molekuly s biologickým účinkem, které mají vliv na chování buněk, tedy na diferenciaci, proliferaci, apoptózu, migraci, sekreci aj. Typickým příkladem jsou růstové faktory, které se podílí na vývoji, reparaci či regeneraci a udržování homeostázy tkání. Jejich působení probíhá na základě interakce s určitým receptorem, který spouští signalizační kaskádu, jež ovlivňuje děje v buněčném jádře. Tento účinek může být specifický či pleiotropní a závisí na řadě dalších podmínek (koncentrace, dynamika změn, stav okolních buněk, hojení, vývoj aj.). Biologicky aktivní látky lze v rámci TE zajistit pomocí jejich zevní aplikace do scaffoldu (např. namočení v rozpustném faktoru; smíchání augmentačního materiálu s PRP - platelet-rich plasma), přímého navázání na strukturu biomateriálu při jeho přípravě (kovalentní vazba) nebo pomocí osazení scaffoldu buňkami, které budou producenty signalizačních molekul, a to přirozeně nebo pomocí genetické modifikace buněk (Tollemar V. et al., 2015; Wolfová L. et al., 2015).

Jako příklady aplikovatelné v kostním tkáňovém inženýrství lze uvést bone-morphogenic factor (BMP), platelet derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor (IGF), fibroblast growth factor (FGF), vascular and endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor (TGF). Všechny uvedené faktory se vyskytují v řadě variant (jejich počet se s pokračujícím studiem navyšuje), které mohou mít odlišné účinky. Mezi nejvíce studované faktory patří BMP (Lee K. et al., 2011; Tollemar V. et al., 2015; Bouyer M. et al., 2016; Giannoudis P.V. et al., 2009).

Typickou klinickou aplikací v orální a maxilofaciální chirurgii je využití PRP (platelet-rich plasma), která obsahuje růstové faktory přítomné v trombocytech, získané centrifugací krevní plasmy (Marx R.E., 1998; 2004), která se uplatňuje od parodontální řízené tkáňové regenerace, augmentačních postupů v rámci dentální implantologie až po řešení rozsáhlých maxilofaciálních traumat a rekonstrukcí. Přestože se jedná o široce užívané postupy, které byly v řadě studií prokazovány, prozatím není jednoznačně potvrzený benefit těchto postupů z pohledu evidence based medicine (EBM; např. Moraes V.Y. et al., 2014; Albanese A. et al., 2013; Stumbras A., 2019; Šimůnek A. et al., 2017).

2.2.4 Využití mikro-CT v hodnocení tkáňových nosičů

Hodnocení struktury tkáňových nosičů

Význam prostorového uspořádání tkáňových nosičů pro jeho funkci byl zmíněn výše. Teprve mikro-CT umožnilo poměrně přesné nedestruktivní hodnocení 3D struktury, a to pomocí vizualizace a kvantifikace. Mikro-CT je využíváno k charakterizaci struktury scaffoldů v různých podmínkách (vývoj nových materiálů, mechanické testování, hydratace, osazování buňkami apod.) a jsou takto získávány informace o strukturních parametrech: objem, povrch, porozita, velikost pórů včetně jejich distribuce, tloušťka stěn, velikost spojení mezi póry, isotropie aj. (popis vybraných parametrů viz 2.1.4 - Tab. 2; ilustrace viz obr. 25).

První práce využívající mikro-CT při hodnocení scaffoldů se často týkají kostního tkáňového inženýrství. Kostní tkáň se totiž stala jednou ze základních oblastí mikro-CT aplikace, s cílem nahradit či doplnit konvenční histomorfometrii, která má řadu nevýhod (2D metoda, časová náročnost, destruktivita, hodnocení celého kostního vzorku je omezené na několik řezů). Další důvod je dán biomimetickým přístupem, kdy kostní tkáňové nosiče jsou většinou mechanicky odolnější a více RTG denzní ve srovnání např. s měkkotkáňovými scaffoldy, a tedy jsou lépe skenovatelné.

S nástupem této nové metody byly provedeny komparativní studie, které ověřovaly přesnost mikro-CT při stanovení histomorfometrických parametrů ve srovnání s histologií. Prezentované výsledky ukazují dostatečnou míru shody (Thomsen J.S. et al., 2005; Gielkens P.F.M. et al., 2008; Liu, H. et al., 2016). Jednotlivé studie se liší typem kostního vzorku (odběrové místo, živočišný druh) a parametry skenu, což je nutné při hodnocení uvažovat. Vliv zpracování obrazu na výsledky uvádí řada prací. Hara a kol. popisuje významný vliv mezi zvoleným postupem binarizace mikro-CT dat a hodnotou strukturních parametrů (Hara T. et al., 2002). Buie a kol. z těchto důvodů navrhuje postup ke zlepšení procesu segmentace a binarizace dat kostní tkáně, a to pomocí virtuální izolace kortikální kosti od okolí v rámci image-processingu a následné duální binarizace kortikální a trabekulární kosti (Buie H.R. et al., 2007). Cooper a kol. uvádí vliv velikosti voxelu na parametry kortikální kosti lidského femuru (kadaverózní vzorky), zejména porozitu a strukturu kortikálních kanálů, jejichž detekovatelnost výrazně klesá s narůstající hodnotou velikosti voxelu (hodnoty 5, 10, 15 μm ; Cooper D. et al., 2007). Shrnutí mikro-CT hodnocení kostní tkáně u hlodavců (nejčastěji užívaný zvířecí model *in-vivo* studií) a potřebu standardizace mikro-CT postupů vysvětluje a popisuje ve své práci Bouxsein a kol. (Bouxsein M.L. et al., 2010).

V rámci optimalizace přípravy scaffoldů navrhuje Van Cleynenbreugel zařadit mikro-CT do první linie rychlého posouzení vybraných strukturních a biomechanických (na základě matematické modelace)

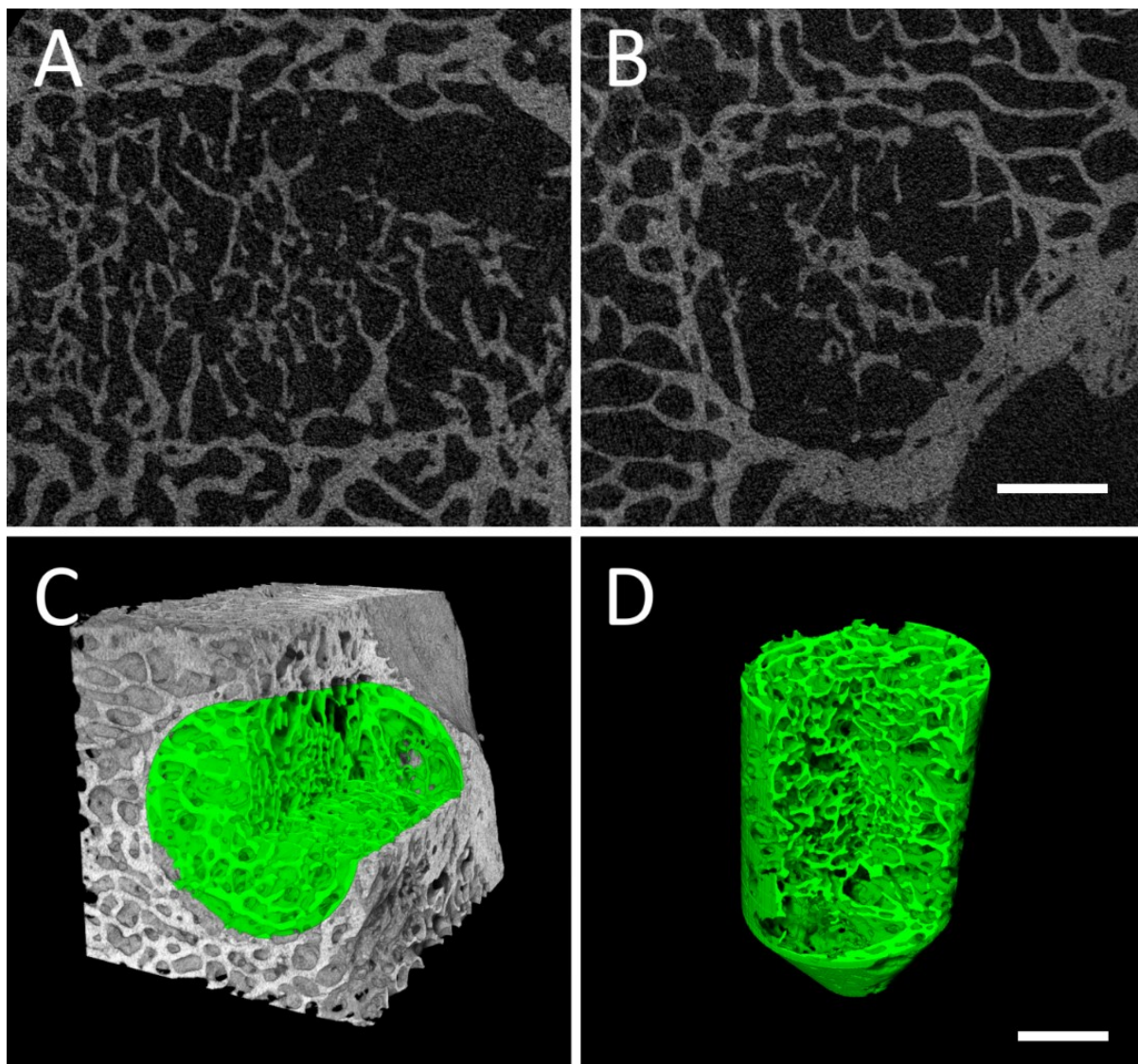
parametrů, které by poskytly zpětnou vazbu při přípravě tkáňových nosičů a její možnou modifikaci (Van Cleynenbreugel et al., 2006). Vybrané perspektivní varianty by byly dále hodnoceny dalšími metodami, které již mohou být časově i finančně náročnější.

Hodnocení struktury vyvíjených tkáňových nosičů je již v posledních patnácti letech klasickou aplikací mikro-CT. S ohledem na doposud nedostatečné klinické výstupy a neustálé hledání nových nosičů s různou strukturou i složením se ale stále jedná o aktuální problematiku. Přehledně se tomuto tématu věnují následující práce, které byly vybrány, aby reprezentovaly pohled v různých časových bodech (Hutmacher D., 2000, van Lenthe G.H., 2007, Peyrin F., 2011, Cengiz I.F. 2018).

Hodnocení tkáňových nosičů v interakci s biologickou tkání

V případě implantace tkáňového nosiče do kostního defektu experimentálního zvířete může být mikro-CT využito k posouzení struktury nosiče, jeho degradace a reakce okolní tkáně. Design studie může být založen na *in-vivo* i *ex-vivo* hodnocení. Rozdíl mezi oběma přístupy byl diskutován v části 2.1.2. V rámci *in-vivo* hodnocení jsou standardně užívány laboratorní myši a potkani, *ex-vivo* hodnocení je často užíváno u větších zvířecích modelů, např. prase či ovce. Obě varianty lze kombinovat, takže v průběhu pokusu jsou v určitých časových intervalech zvířata opakovaně skenována a hodnocena a následně po jejich usmrcení proběhne *ex-vivo* skenování explantovaného vzorku tkáně, který umožní dosažení detailnějších a přesnějších obrazových dat (Schambach S.J. et al., 2010). Mikro-CT je v těchto případech běžně kombinováno s dalšími metodami, zejména histologickým hodnocením, které je z mnoha důvodů nezastupitelné. Ilustrace *ex-vivo* zobrazení je uvedena na obr. 10.

Hodnocení vrůstání kostní tkáně do nosiče v explantovaných vzorcích úspěšně hodnotí pomocí mikro-CT v časných studiích Jones a Cartmell (Cartmell S. et al., 2004; Jones A.C. et al., 2004, 2007). Jones a kol. v roce 2007 hodnotili sedm typů hydroxyapatitových scaffoldů v tibií experimentálního zvířete (ovce) po různé době hojení (33-84 dní). V explantovaném vzorku provedli 3D analýzu segmentovaných dat. Jako hlavní parametry sledovali: objem scaffoldu, objem porozity, interkonektivitu pórů (velikost jejich spojení a tím dostupnost póru), objem kostní tkáně, podíl porozity vyplněné kostní tkání, vztah mezi vzdáleností od povrchu a podílem objemu kostní tkáně v pórech. Osifikace byla výraznější na periferii než v centrální části, dostupnost póru silně korelovala s vrůstáním kostní tkáně a vyšší vrůstání kostní tkáně bylo pozorováno u pórů nad 100 μm .



Obr. 10: Ilustrace ex-vivo mikro-CT hodnocení vzorku kostní tkáně (proximální femur, prase) s vytvořeným defektem vyplněným autologní kostní tkání; 3 měsíce po výkonu (vlastní data; převzato z Bartoš et al., 2018); A, B) průřezové snímky s patrným kostním defektem, kostní novotvorba je však patrná; C) 3D vizualizace kostního vzorku; oblast původního defektu je vyznačena zelenou barvou; D) segmentované 3D zobrazení kostní tkáně v oblasti původního defektu. Měřítko = 2 mm.

V řadě studií je v rámci evaluace kostní tkáně používán parametr BMD (bone mineral density), který odpovídá množství minerálů v objemu kostní tkáně (g/cm^3). Standardní postup představuje spálení vzorku a vážení zbylé masy. Mikro-CT může být použito k nedestruktivnímu stanovení BMD, které vykazuje dostatečnou shodu se standardním postupem. Mikro-CT hodnocení je založeno na RTG denzitě vzorku, která je na BMD přepočtena. Tomu předchází kalibrace za použití alespoň dvou fantomových vzorků (např. Bruker micro-CT BMD calibration phantoms), které aproximují hodnotu obsahu hydroxyapatitu

(hlavní anorganická složka kosti) fantomu určité RTG denzitě. Při hodnocení naskenovaného kostního vzorku tedy může být denzita převedena na BMD (Meganck J.A. et al., 2009). Typickým příkladem je výzkum osteoporózy na animálním modelu, kde v důsledku ovariectomie (model osteoporózy) jsou sledovány kostní změny a případný efekt intervence. Ve studii Dai a kol. je takto prokázána redukce kostních parametrů vč. BMD alveolárního výběžku maxily u myši po ovariectomii (Dai Q.G. et al., 2014). Pro spolehlivé stanovení BMD je nezbytné skenování hydratovaného vzorku, což často obnáší nutnost rehydratace po fixaci. BMD užívá jako referenci celkový objem (Total Volume). Alternativním parametrem je TMD (Tissue Mineral Density), která užívá jako referenční objem kostní tkáně, takže vynechává měkkotkáňový kompartment.

Typickým příkladem mikro-CT *in-vivo* studie v této oblasti je práce Oest a kol. (Oest M.E. et al., 2007). V potkaních femorálních defektech byl studován vliv aplikace scaffoldu s růstovými faktory nebo bez nich (BMP-2, TGF- β 3) na hojení kritických segmentálních defektů. Pomocí mikro-CT byla hodnocena kostní novotvorba v kostním defektu a prostoru scaffoldu. Aplikace nosiče s růstovými faktory zvýšilo množství kostní tkáně. Spolehlivé přemostění defektu však nebylo pozorováno v žádném z postupů, což bylo verifikováno mechanickými testy. Další prací je studie autorů Cao a Kuboyama (Cao H. a Kuboyama N., 2010), při které byly v potkaních distálních femurech (mediální epikondyl) vytvořeny kostní defekty, které byly zaplněny třemi odlišnými materiály (hydroxyapatit a dvě kombinace polyglykolidu a beta-trikalciumfosfátu) a jeden byl ponechán ke spontánnímu hojení, přičemž sloužil jako kontrola. V intervalech 0, 14, 30 a 90 dní od operace bylo provedeno mikro-CT skenování a hodnocení resorpce biomateriálu a hojení kostního defektu. Hlavním hodnoceným parametrem byl BMD (bone mineral density, g/cm³). Vzorky byly dále histologicky zpracovány. Pomocí mikro-CT analýzy a vizualizací vzorku byly pozorovány signifikantní rozdíly mezi jednotlivými postupy, přičemž jako nejvýhodnější byl prezentován poměr 1:3 PGA/ β -TCP.

Mikro-CT v orální a maxilofaciální chirurgii – augmentace kostní tkáně

V rámci parodontologie, stomatochirurgie a dentální implantologie jsou často využívány augmentační postupy, které mají za cíl řešit nedostatek kostní tkáně. V rámci parodontologie se jedná nejčastěji o léčbu důsledků parodontitidy, která vedla k destrukci závěsného aparátu zubu. V určitých indikacích lze pomocí aplikace augmentačního materiálu s využití membrán, které defekt izolují od okolních měkkých tkání a mechanicky stabilizují augmentát, dosáhnout obnovy parodontálních tkání. Hovoříme o konceptu řízené tkáňové regenerace (GTR – guided tissue regeneration). Pokud je cílem dosažení novotvorby kostní tkáně, hovoříme o řízené kostní regeneraci (GBR - guided bone regeneration). S rozvojem a rozšířením dentální implantologie narůstá počet pacientů, u nichž se o této léčbě uvažuje, ačkoliv jejich anatomické poměry nejsou vyhovující. V těchto případech je možné pomocí mnoha různých postupů augmentovat

kostní tkáň, a to i za použití biomateriálů. Další indikací v této oblasti je řešení zánětu v okolí implantátů – periimplantitida.

Jedná se o velice perspektivní oblast jak z pohledu klinického, tak výzkumného, neboť o této problematice dosud neexistuje dostatek relevantních klinických studií. Jednotlivé studie mají nestandardizované postupy, odlišné augmentační materiály, různé doby hojení či různý způsob získání vzorku, což ztěžuje jejich hodnocení a porovnání. Reálná ověřitelnost úspěšnosti těchto postupů u pacientů je limitovaná.

Uvedené téma je nesmírně široké, proto možnosti mikro-CT aplikace budou prezentovány na metodě sinus lift, přičemž aplikace v ostatních oblastech a možnosti použití jsou obdobné. Sinus lift je výkon, který je indikován při potřebě implantace v laterálních úsecích horní čelisti při nevhodných anatomických poměrech, tedy nedostatečném množství kostní tkáně. Jedná se o klinicky osvědčený a často užívaný postup. Principem je elevace Schneideriánské membrány sinus maxillaris otevřeným či uzavřeným postupem a vyplnění vzniklého prostoru augmentačním materiálem. Existuje mnoho způsobů provedení a současně široké spektrum použitelných dostupných materiálů, které mohou být autogenní, xenogenní i aloplastické, případně jejich kombinace.

Ačkoliv se tomuto tématu věnuje mnoho autorů, doposud chybí přesvědčivé práce, zejména rozsáhlé randomizované kontrolované studie, které by porovnávaly efektivitu různých postupů a materiálů. Cochrane Oral Health Group má v souvislosti s užitím sinus lift jedinou review práci (Esposito M. et al., 2014), ve které je konstatován dosavadní nedostatek důkazů, který by umožňoval porovnání různých technik či materiálů. Podobné výsledky prezentuje práce Silva a kol., která zároveň shledává vysokou míru klinické úspěšnosti uvedeného postupu a malé množství komplikací (Silva L.D. et al., 2016).

Možnosti mikro-CT se v této aplikaci jeví jako velice výhodné, avšak s ohledem na charakter metody komplikované, neboť vyžaduje k vyšetření explantaci části augmentované oblasti. To je možná provést trepanobiopicky před zavedením implantátu, avšak je zde limitace množstvím odebrané tkáně a nejistotou ohledně lokalizace původního defektu. Dosavadní využití pro klinické vzorky je proto, jak shora uvedeno, poměrně limitované. Mikro-CT je tak nejčastěji využíváno pro preklinické animální studie, kde je postmortálně s určitým časovým odstupem hodnocen testovaný prostup proti kontrole (např. Saffarzadeh A. et al., 2009). Skupina Zhanga na králičím modelu zkoumala vliv BMP-2 a VEGF na osteogenní potenciál injektovatelného hydrogelu a výsledky hodnotila po 4 a 12 týdnech po výkonu mj. pomocí mikro-CT, kdy byl prokázán aditivní příznivý účinek obou faktorů (Zhang W. et al., 2011). Některé práce vychází přímo z klinické studie, kdy před implantací získávají v místě původní augmentace kostní vzorek, jež podrobují mikro-CT a histologické analýze. Např. Chappard a kol. testovali efekt augmentace β -TCP s autologní kostí a hodnotí tento postup jako úspěšný, ve studii však není žádná

kontrolní skupina (Chappard D. et al., 2010). Efekt různého poměru CaP a β -TCP na objem novotvořené kosti hodnotil Helder pomocí mikro-CT a histomorfometrie (Helder M. N. et al., 2018). Vliv velikosti částic partikulárního augmentačního materiálu (1-2 mm a 0,25-1 mm) deproteinizované bovinní kosti na efektivitu a stabilitu sinus lift výkonu u člověka po 6-9 měsících hodnotil Chackartchi, kdy pomocí klinického CT, mikro-CT a histologie neshledal signifikantní rozdíly (Chackartchi T. et al., 2010).

Využití mikro-CT dat k matematickým modelacím a simulacím

Obrazová data, získaná pomocí mikro-CT, mohou být využita jako základ pro matematické modelování a simulování různých vlivů použitelných v predikci chování (např. při mechanickém zatížení). Příkladem je metoda konečných prvků (MKP, anglicky FEM – finite element modeling), při které je virtuální objekt (model) rozdělen do konečného počtu definovaných bodů s určitými vlastnostmi (např. mechanické parametry). Tím je vytvořena prostorová síť bodů (anglicky mesh), zastupující reálný objekt. V rámci simulace může být tato síť virtuálně libovolně zatížena a následně jsou analyzovány parametry jako např. tah, tlak, napětí uvnitř vzorku, přenos tlaku na okolní tkáň, vznik a propagace fraktur materiálu atp.

Jako příklad užití jsou uvedeny následující práce. Vztah struktury a mechanických vlastností tkáňových nosičů hodnotil Alberich-Bayarri (Alberich-Bayarri A. et al., 2009) konvenčně i pomocí FEM. Limbert a kol. se zabývali hodnocením dentálních implantátů přenosem zatížení na kostní trámce a indukovaným mikropohybem na základě FEM analýzy mikro-CT skenů (Limbert G. et al., 2010). Ridha Hambli využívá mikro-CT dat kostní tkáně k přípravě FEM modelu k predikci fraktur trabekulární kostní tkáně, které poté experimentálně verifikuje a tím validuje představený model (Hambli R., 2013).

2.3 Mikro-CT hodnocení kovového resorbovatelného osteosyntetického materiálu

2.3.1 Úvod

Využití osteosyntetického materiálu je dnes standardním postupem při řešení kostních fraktur. Standardní materiál aplikovaný v kraniofaciální oblasti představuje titan a jeho slitiny (např. Ti6Al4V), a to z důvodu excelentních mechanických vlastností a biokompatibility. Typickým příkladem využití představuje např. řešení kostních zlomenin, endoprotézy temporomandibulárního kloubu, fixace dlah po onkologických resekčních výkonech, fixace mobilizovaných segmentů čelistí při ortognátně-chirurgických výkonech. Výhodami titanové osteosyntézy jsou stabilita, biokompatibilita a dostatečné klinické zkušenosti. Jako nevýhody lze uvést riziko infekce cizorodého materiálu, nutnost sekundární operace v případě potřeby vyjmutí materiálu, nefyziologická modifikace přenosu tlaku na kostní tkáň (stress-shielding), související s možnou lokalizovanou osteopenií, artefakty při zobrazovacích metodách aj. V poslední době se též popisuje narůstající incidence nežádoucích reakcí a alergií na titan, jehož částice se mohou z materiálu uvolňovat a působit lokálně i systémově. Doposud však není k dispozici dostatek studií k uspokojivému zhodnocení této problematiky (Kim K.T. et al., 2019). K eliminaci některých uvedených nevýhod směřuje vývoj resorbovatelného osteosyntetického materiálu, který se však z řady důvodů zatím nestal obecně přijímaným standardním postupem.

2.3.2 Resorbovatelné osteosyntetické materiály

Polymerní materiály

První klinicky testovaný materiál byl α -polyester kyseliny polyglykolové (PGA). Jeho hlavní nevýhodou se ukázala příliš rychlá míra degradace, která vedla k nedostatečné mechanické stabilizaci. Rychlá degradace též vedla ke kumulaci rozpadových produktů, které mohly vyvolávat lokální dráždění. Dalším testovaným polymerem byla kyselina polymlečná (PLA; izoformy PLLA, PDLA). Oba materiály vykazovaly pomalejší míru degradace, poměrně uspokojivé mechanické vlastnosti a biokompatibilitu. Degradace probíhá na základě hydrolytického štěpení vazeb. Kombinací polymerů za vzniku kopolymerů (PDLLA) byla umožněna modifikace a optimalizace materiálových vlastností, která vedla k rozšíření klinického testování a aplikace. Jedním z problémů těchto polymerních materiálů je limitovaná možnost sterilizace, a to gama zářením či etylenoxidem. Resorbovatelné materiály mají horší mechanické vlastnosti než titan, což může jejich aplikaci omezovat v oblastech s potřebou přenosu zátěže (load-bearing regions). Z toho důvodu proto musí zaujímat větší objem, aby dosáhly požadovaných vlastností.

Tím vzniká větší množství materiálu, které musí být degradováno (Schumann P. et al., 2013; Park Y.W., 2015). Aplikace resorbovatelné osteosyntézy je velice výhodná v případě rostoucího skeletu, což představovalo jednu z prvních oblastí aplikace. V řadě klinických studií byly porovnávány resorbovatelné materiály s konvenční titanovou osteosyntézou u ortognátní chirurgie, které nepopisují významné rozdíly mezi oběma metodami (Cheung L.K. et al., 2004; Stockmann P., 2010; Ballon A. et al., 2012). Z pohledu EBM je však úroveň důkazů pro toto hodnocení doposud nízká (Agnihotry A. et al., 2017). Některé práce popisují reakci cizího tělesa na uvedené resorbovatelné materiály (Jeon H. B. et al., 2016). Rozšíření užití brání přetrvávající obavy ohledně mechanických vlastností, biokompatibility a vyšší ceny.

Resorbovatelné kovy

Hlavním studovaným kovem je hořčík a jeho slitiny. Využití hořčíku jako resorbovatelného materiálu v humánní medicíně bylo poprvé uvedeno v roce 1878 k podvazu cév (Witte F., 2015). Jako resorbovatelný osteosyntetický materiál byl poprvé použit ve 30. letech 20. století (Lambotte A., 1932). Použití čistého hořčíku nevedlo k uspokojivým výsledkům. Průběh degradace byl příliš rychlý, což snižovalo stabilitu fixace, která tak byla nedostatečná. Jedním z rozpadových produktů je vodík, který nebyl dostatečně eliminován a vedl k retenci v okolních tkáních. Ve snaze o řešení uvedených nedostatků byly vyvíjeny hořčíkové slitiny, jejichž vlastnosti mohou být optimalizovány. Znovuobjevení hořčíku jako perspektivního materiálu a jeho aplikace počíná kolem roku 2005, kdy se nově vyvíjené slitiny začínají testovat zejména v intervenční kardiologii (resorbovatelné stenty) a ortopedické traumatologii (osteosyntetický materiál). Složení slitin, jejich příprava, obrábění a povrchové modifikace jsou intenzivně studovány, protože mohou významně ovlivnit výsledné vlastnosti. Degradace probíhá za vzniku vodíku a hydroxidu hořečnatého ($\text{Mg} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mg}(\text{OH})_2 + \text{H}_2$), který alkalizuje okolní prostředí a může vést k precipitaci kalciumfosfátu, jež může lokálně stimulovat tvorbu kostní tkáně (Witte F. et al., 2005). Další degradační produkty se liší dle konkrétního složení slitiny. Proces degradace *in-vivo* prozatím není plně vysvětlen. Zásadní otázkou je schopnost organismu eliminovat rozpadové produkty a zabránit jejich kumulaci v orgánech. Studium materiálů, které se při *in vitro* testech osvědčily, byly převedeny do *in-vivo* pokusů, které se však prozatím týkají nejvíce malých zvířat (potkan, králík). Reálné chování resorbovatelných kovů při aplikaci v humánní medicíně lze tedy prozatím jen těžko odhadovat. (Schaller B. et al., 2016; Schumann P. et al., 2013).

Výhodou resorbovatelných kovů oproti polymerním materiálům jsou lepší mechanické vlastnosti, absence kyselých rozpadových produktů a uspokojivá detekce zobrazovacími metodami založenými na RTG záření. Mechanickou výhodou oproti titanu je elasticita podobná kostní tkáni, která by redukovala stress-shielding. Sterilizace je vhodná pomocí gama záření. Přetrvávajícím problémem je nastavení vhodného průběhu degradace, kumulace vodíku při degradaci materiálu, možné lokální dráždění, periostální reakce

a přerůstání materiálu kostní tkáně. Příliš rychlá degradace může vést k nedostatečnému kontaktu s okolní kostní tkáně a tím k nedostatečné stabilitě fixace. Příliš pomalá degradace blokuje kostní hojení v místě implantátu a zhoršuje mechanické vlastnosti a odolnost v daném místě skeletu (Kraus T. et al., 2012; Schumann P. et al., 2013). Současné preklinické studie se zdají být nadějně.

2.3.3 Mikro-CT hodnocení degradace resorbovatelných kovů v biologickém prostředí

Mezi základní studované parametry hořčkových slitin v in-vivo podmínkách patří jejich degradace. Hodnotitelnost pomocí mikro-CT mj. závisí na RTG denzitě použitého materiálu, což je dáno složením slitiny. V případě příliš vysoké denzity není vzorek hodnotitelný. Základními variantami je *ex-vivo* (skenování explantovaného materiálu) a *in-vivo* použití (skenování živých zvířat). Nejvýhodnější přístup je *in-vivo* skenování, které je aplikováno v definovaných časových intervalech. Po dobu trvání experimentu lze sledovat a hodnotit stejný implantát v různém čase. Efektivita studie je tímto zvýšena, protože dochází k redukci nutného počtu experimentálních zvířat. Druhá varianta, *ex-vivo* studie, umožňuje dosažení vyššího rozlišení. Navíc lze získat histologické vyšetření toho samého vzorku. Mikro-CT patří mezi zásadní metody, které se k hodnocení jejího průběhu používají (Schaller B. et al., 2016; Amerstorfer F. et al., 2016; Fischerauer S.F. et al., 2013; Kraus T. et al., 2012).

Materiál implantátu postupně degraduje. S klesajícím objemem narůstá po určitou dobu velikost povrchu v důsledku vzniku povrchových nerovností. Tento nárůst zároveň zvětšuje povrch, který je k dispozici pro degradaci a tím její průběh urychluje. Postupně lze pozorovat fraktury a tvorbu izolovaných fragmentů materiálu. Okolní kostní tkáň na přítomnost materiálu reaguje, často jsou patrné osteokondutivní vlastnosti. V oblasti okolního periostu je běžně popisována výrazná novotvorba kostní tkáně, která může vést k přerůstání původního implantátu. Všechny tyto děje jsou pomocí mikro-CT dobře detekovatelné. Získaná data jsou použitelná k vizualizaci a mohou být kvantifikována k posouzení výše uvedených parametrů.

3 Metodika: využití mikro-CT

V této části je přehledně shrnuta mikro-CT metodika využívaná při řešení odborných témat, která jsou prezentována v disertační práci. Kompletní metodika uvedených projektů je popsána v publikovaných článcích a je případně doplněna v komentáři (viz kapitola 4).

3.1 Příprava vzorků ke skenování

V závislosti na charakteru vzorků byla použita rozdílná příprava k mikro-CT skenování.

- **„Suché“ pevné vzorky** (například tkáňový nosič):
 - fixace vzorku v požadované orientaci na nosič vzorku (specimen holder) pomocí dentálního výplňového materiálu (flow kompozit), vosku, modelovací hmoty aj.;
 - je vhodné centrální umístění vzorku ve skenovací komoře a orientace podélné osy vzorku s osou rotace nosiče vzorku (micro-stage).
- **„Mokrý“ vzorky** (hydratovaný tkáňový nosič, biologický vzorek – např. implantát v kostní tkáni):
 - skenování musí probíhat ve zkumavce s nízkým RTG kontrastem, nejlépe plastové;
 - s ohledem na další plánované hodnocení vzorku (např. histologie) je zvoleno médium, ve kterém je vzorek umístěn (voda, etanol, fixace formolem apod.); tekutina zvyšuje RTG denzitu pozadí;
 - vzorek musí být ve zkumavce stabilizován, aby při skenování nedošlo ke vzniku pohybových artefaktů v důsledku vyrovnávání deformace tkáně či přítomnosti koncentračních gradientů (např. nativní vzorek umístěný do etanolu a ihned skenován), dobu stabilizace je nutné empiricky ověřit;
 - zkumavka je umístěna na nosič vzorku a fixována.

V případě potřeby zvýšení RTG kontrastu vzorku bylo postupováno na základě protokolů uvedených Metscherem (Metscher B.D., 2009; viz obr. 3). Pro kontrastování scaffoldů byl po pilotních testech jako nejvhodnější zvolen Lugolův roztok.

3.2 Mikro-CT skenování

K mikro-CT skenování vzorků byl použitý stolní *ex-vivo* mikro-CT přístroj SkyScan 1272 (Bruker micro-CT, Kontich, Belgie; viz obr. 2) a výrobcem dodaný software. Skenovací parametry byly nastaveny s ohledem na typ vzorku, požadavky na zobrazení a následné analýzy. Skenováním je vytvořen dataset projekčních snímků. Před samotným skenováním je nutné, aby byl RTG zdroj určitý čas v provozu (cca

15 minut), čímž se redukuje možná přechodná počáteční nestabilita (kolísání energie záření). Po nastavení skenovacích parametrů vhodné pro studovaný vzorek je důležité provést tzv. flat-field korekci, která redukuje nepravidelnosti sensoru CCD. Vzorkem, který je umístěn na micro-stage mikroskopu, je možné pohybovat a nastavit jeho vhodnou polohu. Nejvyšší kvalita zobrazení je dosažena v centrální části zorného pole (field of view, FOV), do kterého jsme naše vzorky směřovali. Pokud vzorek přesahuje FOV, je možné jej postupně skenovat v několika polích (horizontálně i vertikálně) a takto získané datasety v rekonstrukci spojit do jednoho. Významně však narůstá časová i datová náročnost.

- **Velikost pixelu:**

- rozsah přístroje je 0,35 μm – 21 μm ;
- stanovené hodnoty jsou definovány požadovaným rozlišením skenu, předpokládanou strukturou, velikostí vzorku a často provozními možnostmi (přijatelný skenovací čas).
- Vybrané hodnoty nejčastěji užívané v našich projektech:
 - tkáňový nosič: 4 – 6 μm
 - kostní tkáň: 5-10 μm
 - implantát v kostní tkáni: 11 μm .
- V rámci pilotní studie nebyly nalezeny signifikantní rozdíly při hodnocení základních morfometrických parametrů u skenů kostní tkáně na 5 a 10 μm (testováno na prasečím femuru).

- **Nastavený filtr:**

- možné varianty: bez filtru; 0,25 mm Al; 0,5 mm Al; 1 mm Al; Al 0,5+Cu 0,038 mm; Cu 0,25 mm;
- výměna filtru je automaticky spojena se změnou proudu a napětím rentgenky;
- volba je závislá na typu vzorku a jeho RTG denzitě;
- v našich projektech bylo užito celé spektrum možných variant.

- **Průměrování snímku (frame averaging):**

- cílem užití je zvýšení kvality obrazových dat na základě zlepšení poměru signálu a šumu;
- hodnota byla stanovena v závislosti na typu vzorku a skenovacím čase, který tímto může významně narůstat;
- u většiny vzorků byly definovány hodnoty parametru 2-5, v případě vzorků s kombinací materiálů různých denzit byly preferovány vyšší hodnoty k lepší detekci těchto rozhraní.

- **Rotace vzorku:**

- standardně bylo užito rotace vzorku v průběhu skenu o 180°;

- v případě kombinace materiálů různých denzit byla preferována rotace o 360° (implantát v kostní tkáni, kompozitní nosiče).

3.3 Rekonstrukce projekčních snímků

Pro rekonstrukci byl využit oficiální software výrobce NRecon a InstaRecon (Bruker micro-CT, Kontich, Belgie). Základním krokem je definování převodu hodnoty atenuačního koeficientu, který náleží každé základní objemové jednotce (voxel), na hodnoty stupňů šedi. Většinou je hodnota maxima nastavena o něco výše, než je nejvyšší hodnota atenuace a v daném datasetu, aby nedošlo k saturaci obrazu. V případě, že však dataset obsahoval materiály velice rozdílných hodnot (tkáňový nosič tvořený kolagenem a hydroxyapatitem), bylo využito saturace denzních částí objektu, aby struktury s nižší hodnotou atenuace byly dobře patrné. Nastavení rekonstrukčních parametrů je možné testovat pomocí funkce fine-tuning, která umožní vytvořit sérii rekonstruovaných náhledů 2D snímku a tak hodnotit, jaké nastavení vede k lepšímu výsledku. V původního datasetu lze ve 3D vybrat oblast, která bude předmětem rekonstrukce, což umožní redukovat datovou náročnost. Software umožňuje aplikaci korekčních faktorů na základní obrazové artefakty (ring artifact, beam hardening, misalignment). Pokud jsou přítomny výraznější kruhové artefakty, pravděpodobně jako důsledek nečistot na sensoru, lze využít ke korekci defect pixel masking. Výstupem rekonstrukčního procesu je dataset průřezových snímků (cross-section images; kolmé na z osu).

3.4 Vizualizace

Zobrazení naskenovaných vzorků bylo dosaženo několika způsoby, při využití oficiálního softwaru výrobce DataViewer a CTVox (Bruker micro-CT, Kontich, Belgie).

- 2D zobrazení:

- průřezové snímky jsou zhotoveny v libovolně zvolených rovinách (viz obr. 1);
- kvalita obrazu vychází z rekonstruovaného datasetu, v případě rotace původní roviny je tato dopočítána;
- zobrazení umožňuje i měření vzdáleností.

- 3D zobrazení:

- 3D snímky byly připraveny pomocí programu CTVox, který je založen na zobrazení 3D datasetu (volume rendering) a přiřazení určitých parametrů (opacita, světelnost, barva apod.) každému voxelu na základě jeho hodnoty stupně šedi (definovaného při rekonstrukci s ohledem na hodnotu atenuačního koeficientu; viz obr. 1);

- datasety vizualizované CTVoxem byly buď nativní nebo modifikované pomocí analyzačního programu (segmentace obrazu, redukce šumu aj.);
- s výhodou bylo užito zobrazení několika modifikovaných datasetů, které vznikly segmentací původního datasetu, umožňující zobrazit každý z nových datasetů odlišně (např. barevně odlišit kost a implantát; viz obr. 5);
- v případě hodnocení porozity byla využita možnost spojení zobrazení a výsledku analýzy, a to pomocí color-coded mode, kdy lze určité hodnotě tloušťky struktury přiřadit konkrétní barvu, a tedy barevné spektrum představuje zároveň měřítko (viz obr. 25). V našich projektech byl tento postup využit u vizualizace porozity tkáňových nosičů.

3.5 Modifikace dat a jejich analýza

Rekonstruovaná data byla většinou před dalším využitím modifikována (příklad viz obr. 9), k čemuž byl využit software výrobce CTAn (CT analyser; Bruker micro-CT, Kontich, Belgie).

- **V rámci modifikace dat před plánovanou vizualizací a analýzou struktury byly využity následující postupy** (výčet není vyčerpávající, pořadí postupů se liší dle konkrétní situace):
 - **výběr oblasti zájmu (Region of Interest, ROI)**
 - výběr probíhá v určených řezech (určitá poloha v z ose), výběr v řezech mezi vybranými úrovněmi je dopočítán interpolací dle definovaných parametrů.
 - Varianty stanovení ROI:
 - manuální (ruční výběr);
 - vložení definovaného geometrického tvaru;
 - využití binarizovaného objektu, který byl převeden na oblast zájmu (např. rozsah kostní tkáně);
 - použití algoritmu Shrink-wrap, při kterém se od okrajů datasetu virtuálně zmenšuje oblast zájmu, až zcela pokryje objekt a tím definuje VOI; je nutné nastavit funkci překračování otvorů (stretch over the holes), aby VOI nevnikl dovnitř vzorku, pokud to není cílem (např. při simulaci pronikání objektu určité velikosti do porozity objektu).
 - **Obrazová filtrace** (redukce šumu, rozostření, detekce hran aj.)
 - **Binarizace**
 - je nezbytná před provedením analýzy strukturních parametrů;

- vybraný způsob byl založen na pilotním testování a porovnávání možných variant;
 - tento proces je často zatížen subjektivitou při výběru konkrétního postupu (pokud není vybrána automatická metoda binarizace) a má značný vliv na dosažené výsledky;
 - v některých projektech byla úspěšně použita nejjednodušší varianta, kterou je globální threshold (např. kostní tkáň);
 - u některých typů vzorků (tkáňové nosiče) se ukázal být výhodnější adaptivní threshold, který zohledňuje lokální situaci při binarizaci konkrétního pixelu/voxelu (tkáňové nosiče).
- **Despeckle operace u binarizovaných dat**
 - umožňuje odstranění objektů, resp. porozity, dle jejich velikosti;
 - příkladem jsou příkazy: odstraň objekty menší než 20 voxelů; odstraň všechny objekty kromě největšího (tzv. sweep);
 - umožňuje eliminaci šumových pixelů; odstranění uzavřených pórů.
 - operace může být nastavena ve 2D i 3D.
 - **Bitwise operace**
 - umožňují práci s paralelními daty pomocí základních logických operátorů;
 - např. využití vytvořené oblasti zájmu ROI/VOI k jeho odečtení od základního datasetu (př. odečtení pozadí od objektu), což probíhá následovně: binarizace základního datasetu („Image“), inverze objektu a pozadí Bitwise operací s NOT operátorem (Image = NOT Image), převedení objektu na ROI (Region of Interest = Image), nahrání původního nebinarizovaného datasetu, provedení Bitwise operace za užití SUB operátoru – subtraction, odečtení (Image = Image SUB Region of interest), což vede k vytvoření datasetu s původním objektem, jehož pozadí bylo odečteno.
 - **Morfologické operace**
 - umožňují např. zvětšení či zmenšení objemu objektu (funkce dilatace a eroze).
 - jsou využitelné např. při hodnocení kontaktu implantátu a kostní tkáně (BIC - bone implant contact), kdy z důvodu kovových artefaktů je nutné posunout hranici hodnocení o 5-7 pixelů, k čemuž je velice vhodná funkce dilatace.
 - **Export** souboru pro zobrazování metodou surface rendering nebo pro 3D tisk
 - **Provedení analýzy strukturních parametrů** (viz str. 24)
 - varianty 3D (celý dataset) a 2D (jednotlivé řezy).
 - hodnocení celého datasetu nebo jednotlivých objektů.

4 Výsledky a diskuse (včetně komentáře k prezentovaným publikacím)

V této části jsou uvedeny jednotlivé projekty, které byly při řešení hlavních a vedlejších cílů doktorského studia provedeny. Jejich výsledky byly publikovány formou článků v časopisech s impaktovým faktorem. Následující text sestává z uvedení jednotlivých publikací, jejich hlavních výsledků, diskuse a komentářů. Uvedené publikace jsou v celém rozsahu v příloze této dizertační práce.

4.1 Validace a kritické zhodnocení mikro-CT analýzy

4.1.1 Porovnání hodnocení porozity tkáňových nosičů pomocí mikro-CT a skenovací elektronové mikroskopie (SEM)

Komentář k publikaci: **Note on the use of different approaches to determine the pore sizes of tissue engineering scaffolds: what do we measure?**

Bartoš M., Suchý T., Foltán R.

BioMedical Engineering Online. (2018) 17:110

doi: 10.1186/s12938-018-0543-z.

IF= 2,013

Porozita a velikost pórů tkáňových nosičů představuje jeden ze zásadních parametrů ovlivňující interakci s okolní tkání. Přestože mnoho studií na základě svých výsledků doporučuje určité hodnoty velikosti pórů, není doposud ustanoven konsensus ohledně metodologie měření, čímž se interpretace výsledků komplikuje. V řadě studií není konkrétní postup stanovení velikosti póru detailně uveden.

Struktura tkáňových nosičů je vedle běžné optické mikroskopie standardně hodnocena pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Jejimi přednostmi je vysoké rozlišení (významně přesahující možnosti mikro-CT), dostupnost a dosavadní široké užití v této oblasti. Struktura je hodnocena na základě získaných snímků. Nevýhodou je nutnost přípravy řezů ze zkoumaného vzorku a úprava povrchu (pokryv povrchu vodivou vrstvou), což může vést k poškození struktury. Hodnocení je založeno na 2D informaci, takže usuzování na 3D strukturu může být komplikované, protože orientace řezu, zvláště v případě heterogenních vzorků, ovlivňuje dosažené výsledky. SEM zajišťuje i určitou hloubku zobrazení, což vede k lepší představě o zkoumaném materiálu, avšak může činit obtíže při rozhodování, zda např. dva sousední póry v úrovni řezu komunikují či nikoliv. Kvantifikace je většinou provedena manuálním měřením různých snímků ve speciálních programech. Hodnocení velikosti pórů může být subjektivně ovlivněno, protože se většinou vybírá pouze určitý počet proměřovaných pórů z celkového množství.

Mezi konvenční metody charakterizace struktury patří např. výpočetní postupy (výpočet porozity na základě objemu scaffoldu a hustoty použitého materiálu). Porozita může být stanovena s využitím

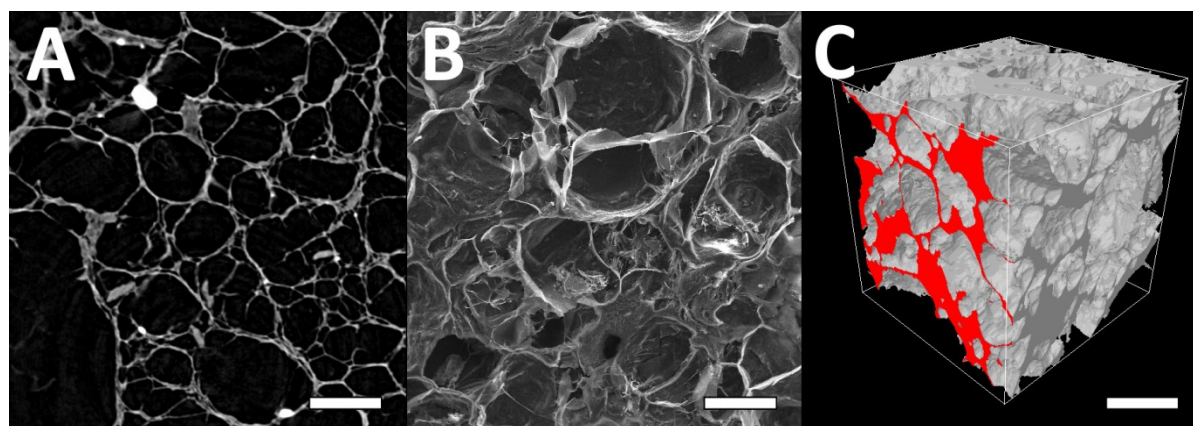
gravimetrických metod (např. metoda trojího vážení) a změn hmotnosti v souvislosti s hmotností tekutiny, kterou porézní materiál dokáže pojmout. Otevřená porozita a velikost pórů je hodnotitelná pomocí intruze rtuti (vstup rtuti do struktury scaffoldu v závislosti na dosaženém tlaku) (Ho S.T. a Hutmacher D.W., 2006). Nevýhodou těchto postupů je vliv hydrofobicity či naopak hydrofility materiálu na výsledky a možná alterace struktury (např. u intruze rtuti). K výrazným nepřesnostem pak může docházet v případě materiálů, které mohou použitou tekutinou nasáknout.

Velikost pórů, jejich distribuce a interkonektivita spolu s permeabilitou mají zásadní roli pro vrůstání buněk do nosiče, jejich migraci, rozvoj vaskularizace, difusi živin a kyslíku a současně odvod odpadních produktů. Vyšší hodnoty porozity zároveň zhoršují mechanické vlastnosti. V závislosti na velikosti pórů se hovoří o makro ($>100\text{ }\mu\text{m}$) a mikroporozitě ($<50\text{ }\mu\text{m}$). Jako optimální hodnota velikosti pórů pro kostní tkáňové inženýrství se většinou uvádí $200\text{--}300\text{ }\mu\text{m}$ (Bose S. et al., 2012; Murphy C.M. et al., 2010), některé studie uvádí jako spodní hranici $100\text{ }\mu\text{m}$ (Jones A.C. et al., 2007 a 2009). Mikroporozita je původně často hodnocena jako nedostatečná pro umožnění buněčné migrace dovnitř pórů a následné osteogenní diferenciaci. Tento názor však rozporuje již v roce 2002 Itälä a kol. (Itälä A.I. et al., 2002), kdy prokazuje vrůstání kostní tkáně i do prostoru mikroporozity. V novějších studiích se potvrzuje význam mikroporozity pro kostní hojení a stává se významným parametrem (Lan Levengood et al., 2010a; Zhang 2018). Je zajímavé, že přestože jsou ve studiích běžně prezentovány vhodné velikosti pórů a zdůrazňován jejich význam, není standardizována technika hodnocení tohoto parametru. Většina studií vychází z manuálního či semiautomatizovaného měření SEM snímků. Podobným způsobem lze vyhodnotit i matici nosiče, tedy její objemový podíl (komplementární hodnota k celkové porozitě), povrch, tloušťku a mnoho dalších (vybrané parametry jsou uvedeny v tab. 2). Efekt BMP-2 na hojení kostní tkáně v kombinaci s heterogenní porozitou studoval Lan Levengood (Lan Levengood et al., 2010b), přičemž popisuje větší vliv BMP-2 na ossifikaci v mikropórech než makropórech, což hodnotil pomocí mikro-CT. Mineralizaci mikroporozity a jejímu významu se v nedávné době věnoval Rustom a kol., (Rustom E.L. et al., 2019), avšak pro její hodnocení doporučuje konvenční postupy (histologie, SEM) nebo nano-CT z důvodu možného nedostatečného rozlišení mikro-CT.

Hlavní cíle práce:

- porovnat na reálných vzorcích tkáňových nosičů na bázi kolagenu hodnoty velikosti pórů, získané mikro-CT a konvenční SEM analýzou;
- posoudit výsledky dosažené pomocí vybraných mikro-CT 2D (uvažované jako jednoduché a časově efektivní) a 3D postupů analýzy (uvažované jako teoreticky nejpresnější metoda);
- porovnat jednotlivé metody mezi sebou a posoudit jejich výhody a nevýhody.

Pro účely studie bylo připraveno sedm typů porézních kompozitních tkáňových nosičů, které se lišily metodou přípravy, konkrétně koncentrací genipinu, který byl použit pro síťování kolagenu (cross-linking) a teplotou při síťování. Modifikace původního vzorku vedla k přípravě šesti dalších typů (tři koncentrace genipinu – MIN, MID, MAX; dvě teploty 37°C a RT – pokojová teplota), které se lišily 3D strukturou. Vzorky byly označeny ORIG (původní), RT MIN, RT MID, RT MAX, 37 MIN, 37 MID, 37 MAX. Vzorky byly pomocí mikro-CT naskenovány, data rekonstruována, vizualizována a analyzována. Vizualizace byly vytvořeny pomocí průřezových snímků, 3D snímků a 3D zobrazení porozity s barevně kódovanou velikostí pórů (obr. 25). Vzorek byl následně analyzován pomocí SEM. Porovnání vizualizací je na obr. 11. Při rekonstrukci byly při převodu do stupňů šedi satureovány denzní hydroxyapatitové částice, což vedlo k dostatečnému kontrastu matrice tkáňového nosiče. Vliv obrazových artefaktů nebyl významný. V oblasti tenkých stěn nosiče se projevoval partial volume effect, který arteficiálně snižuje RTG denzitu materiálu a působí obtíže při binarizaci. Cílem binarizace bylo zachovat stěny nosiče a zároveň eliminovat šumové pixely, a to zejména uvnitř pórů, protože mohou významně redukovat hodnoty velikosti pórů vypočítaných sphere-fitting algoritmem.

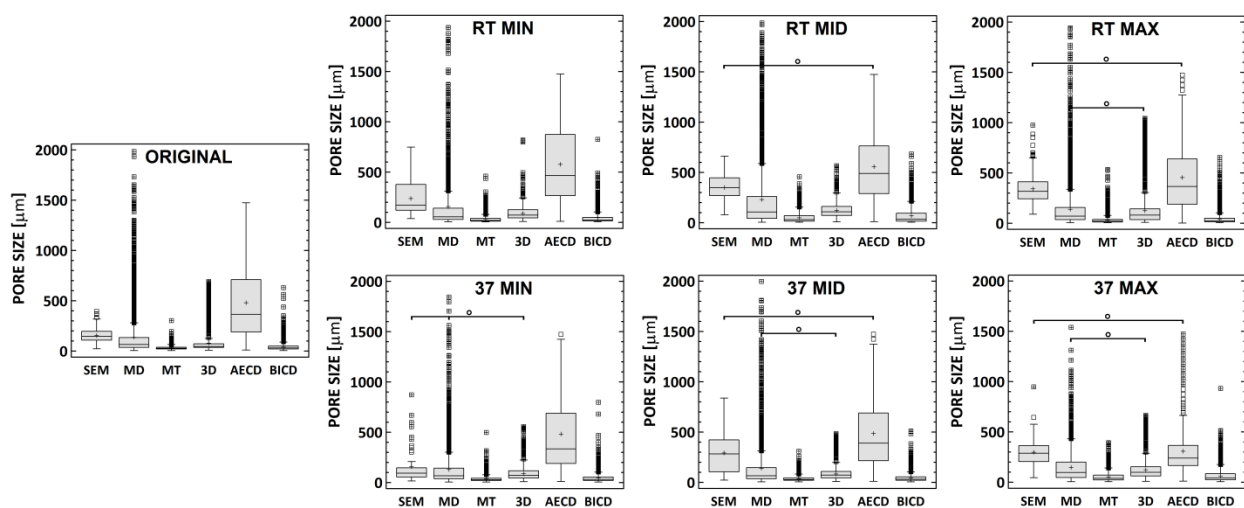


Obr. 11: Srovnání mikro-CT a SEM zobrazení tkáňového nosiče: A) mikro-CT 2D zobrazení; B) SEM; C) mikro-CT 3D rekonstrukce. Měřítko = 400 μ m. Ilustrace z uvedené publikace.

Pomocí 2D analýzy bylo v pěti průřezových snímcích u každého vzorku provedeno vyhodnocení velikosti pórů pomocí čtyř odlišných parametrů (detailní popis parametrů viz v textu publikace, stručně: Major Diameter (MD) – největší průměr; Mean Thickness (MT) – „průměrná“ tloušťka; Area Equivalent Circle Diameter (AECD) - průměr kruhu ekvivalentního obsahu; Biggest Inner Circle Diameter (BICD) - průměr největšího kruhu vepsaného do póru). Data byla následně analyzována ve 3D na základě přímé analýzy 3D modelu užitím sphere-fitting algoritmu (3D; Hildebrand T. a Rüeggsegger P, 1997). Následně byly naskenované vzorky připraveny k hodnocení pomocí SEM, a to na základě manuálního proměřování

v programu ImageJ (<http://image.j.nih.gov/ij/>) průměrné velikosti 40 pórů v pěti řezech u každého vzorku. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny.

Velikost pórů se výrazně lišila v závislosti na použitém parametru, většinou statisticky významně (obr. 26). S ohledem na negausovské rozložení hodnot byly k popisu použity hodnoty: medián, 1. a 3. kvartil. Hodnoty mediánu byly v širokém rozmezí 20 μm a 490 μm . Velikost pórů (medián) byla v sestupném pořadí: AECD (378,6 μm), SEM (235,6 μm), 3D (78,4 μm), MD (75,3 μm), BICD (31,9 μm), and MT (27,9 μm). Významným výsledkem byl u většiny vzorků poměr SEM a 3D mikro-CT hodnot $\sim 3:1$.

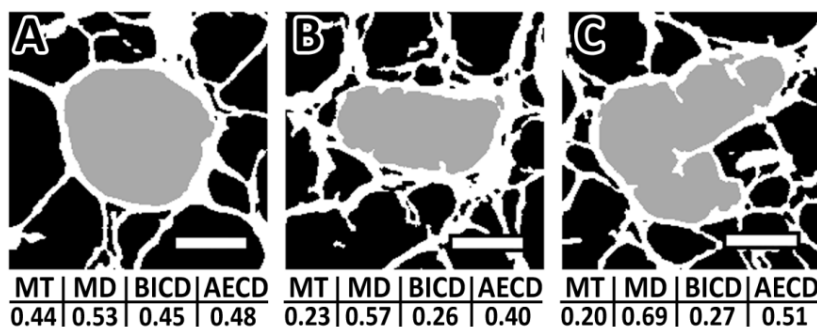


Obr. 12: Srovnání různých parametrů využitých k hodnocení velikosti póru (SEM, MD, MT, 3D, AECD, BICD) u různých vzorků. Rozdíly mezi hodnotami jsou signifikantní kromě označení ° ($p \leq 0,05$). Ilustrace z uvedené publikace.

Hodnocení velikosti pórů biomateriálů se složitou strukturou představuje problém. Uspořádání porozity totiž spíše odpovídá systému propojených dutin a větvičích se kanálů, než izolovaných koulí, jak může mylně vyplývat ze 2D zobrazení. Vhodný parametr k popisu je tedy nejistý. Z principu měření námi hodnocených parametrů by měl být teoreticky nejpřesnější mikro-CT 3D postup, který popisuje rozměr pórů ve všech směrech. Jeho nevýhody však souvisí s obecnými nevýhodami mikrotomografie (viz výše) a v tomto případě je to zejména omezené rozlišení, které může být nedostatečné k detekci tenkých sept; toto může být akcentováno obrazovými artefakty či jevy (partial volume effect). Tento výpočet také může být ovlivněn přítomností šumu, který může významně redukovat hodnotu stanovené velikosti póru (viz Fig. 3 v publikaci).

Posouzení uvedených metod na základě přesnosti je též problematické, protože skutečná hodnota není známa. K vzájemnému porovnání metod byla využita hodnota variačního koeficientu, která však s ohledem na vysoký rozptyl hodnot daný strukturou vzorku (kombinace pórů různé velikosti) prokázala

rozdíly pouze mezi Major Diameter a SEM či mikro-CT 3D hodnotami. Vysoký rozptyl hodnot může reflektovat skutečnou situaci nebo může být důsledkem nepřesnosti dané metody, případně kombinací obojího. K vzájemnému porovnání metod bylo provedeno semikvantitativní hodnocení popisující výhody aplikace jednotlivých parametrů (časová efektivita, 3D analýza, nedestruktivita, rozšíření metody aj.). Jako největší přednosti mikro-CT byly hodnoceny: nedestruktivita, hodnocení celého vzorku (tedy ne pouze několika řezů) a hodnocení pórů nepravidelného tvaru (v důsledku sphere-fittingalgoritmu). Nevýhodou je naopak limitované rozlišení, vlivy obrazového šumu, artefaktů aj. a doposud omezené rozšíření metody.



Obr. 13: Ilustrace vlivu tvaru póru (šedá barva) na dosažené hodnoty vybraných parametrů (mm). Měřítka = 200 μ m. Ilustrace z uvedené publikace.

Závěrem lze konstatovat, že stanovená velikost pórů významně závisí na vybrané metodě. Jako nejvýznamnější se nám jeví provedené srovnání 3D mikro-CT a SEM metody, kdy SEM metoda dosahovala výrazně vyšších hodnot než mikro-CT (přibližně trojnásobně). Jako vysvětlení uvádíme selekční bias při výběru pórů pro manuální měření a možný vliv obrazového šumu při sphere-fitting výpočtu. Jako významný faktor, který ovlivňuje výsledky, je tvar pórů (obr. 13). Většina parametrů spolehlivě popisuje hodnotu pravidelných, kulovitých pórů. V případě komplexnější struktury se hodnoty jednotlivých parametrů rozcházejí. Exaktní porovnání přesnosti metod není možné, protože neznáme reálné hodnoty, které by tvořily referenci. Na základě semikvantitativního porovnání vybraných charakteristik (destruktivita, časová efektivita, 3D hodnocení, dostupnost aj.) námi testovaných metod vychází jako nejvýhodnější mikro-CT 3D analýza.

Využití mikro-CT v rámci projektu:

- charakterizace struktury sedmi typů modelových vzorků pomocí 2D a 3D vizualizací a analýz;
- analýza čtyř 2D mikro-CT parametrů jako návrh časově efektivní automatizovatelné alternativy 2D hodnocení;
- vyhodnocení velikosti pórů pomocí přímé 3D analýzy metodou sphere-fitting.

4.1.2 Možnost virtuální kalibrace mikro-CT analýzy

Komentář k publikaci: **Generating standardized image data for testing and calibrating quantification of volumes, surfaces, lengths, and object counts in fibrous and porous materials using X-ray microtomography.**

Jiřík M., Bartoš M., Tomášek P., Malečková A., Kural T., Horáková J., Lukáš D., Suchý T., Kochová P., Hubálek Kalbáčová M., Králíčková M., Tonar Z.

First two authors contributed equally to the manuscript

Microscopy Research & Technique (2018) Jun;81(6):551-568.

doi: 10.1002/jemt.23011

IF=1,327

Mikro-CT výsledky 3D parametrů struktury vzorku většinou popisují vzorek o neznámé hodnotě těchto parametrů. V případě evaluace materiálu, jehož složení je poměrně jednoduché, lze konvenčními metodami tyto parametry zjistit a použít jako referenci. Pokud jsou však analyzovány komplexní struktury se složitou, často hierarchicky organizovanou strukturou s četnými kolidujícími částmi (např. kostní trámčina, porézní biomateriál, textilní vzorek), situace je výrazně komplikovanější. U většiny vzorků je problematické ověřit spolehlivost mikro-CT výsledků. Řešením by bylo skenování a analýza kalibračních fantomů komplexní struktury na úrovni mikrometrů s přesně definovanými prostorovými parametry. Dosud však není k dispozici metoda, která by s dostatečnou spolehlivostí k tomuto účelu mohla být použita.

Mikro-CT analýza založená na kvantifikaci 2D a 3D strukturních parametrů většinou vyžaduje segmentaci obrazových dat – nejčastěji binarizaci, což znamená převedení obrazu ze stupňů šedi do černobílého zobrazení. To znamená jednoznačné rozdělení obrazu na objekt a pozadí. Tento proces může velmi významně ovlivňovat dosažené výsledky, stejně tak jako modifikace obrazu – image processing (redukce šumu, filtrace aj.), které jsou provedeny před i po binarizaci. Zkreslení (bias), které je tímto uvedeno, je neznámé.

Cílem této práce bylo využít softwarově vygenerované datasety obsahující 3D objekty o známých prostorových parametrech k posouzení vlivu obrazových modifikací a zejména binarizace na výsledky 3D analýzy. Pro tyto účely byl ve spolupráci s biomatematikem Miroslavem Jiříkem vyvinut software TeIGen (Test Image Generator), který toto umožňuje.

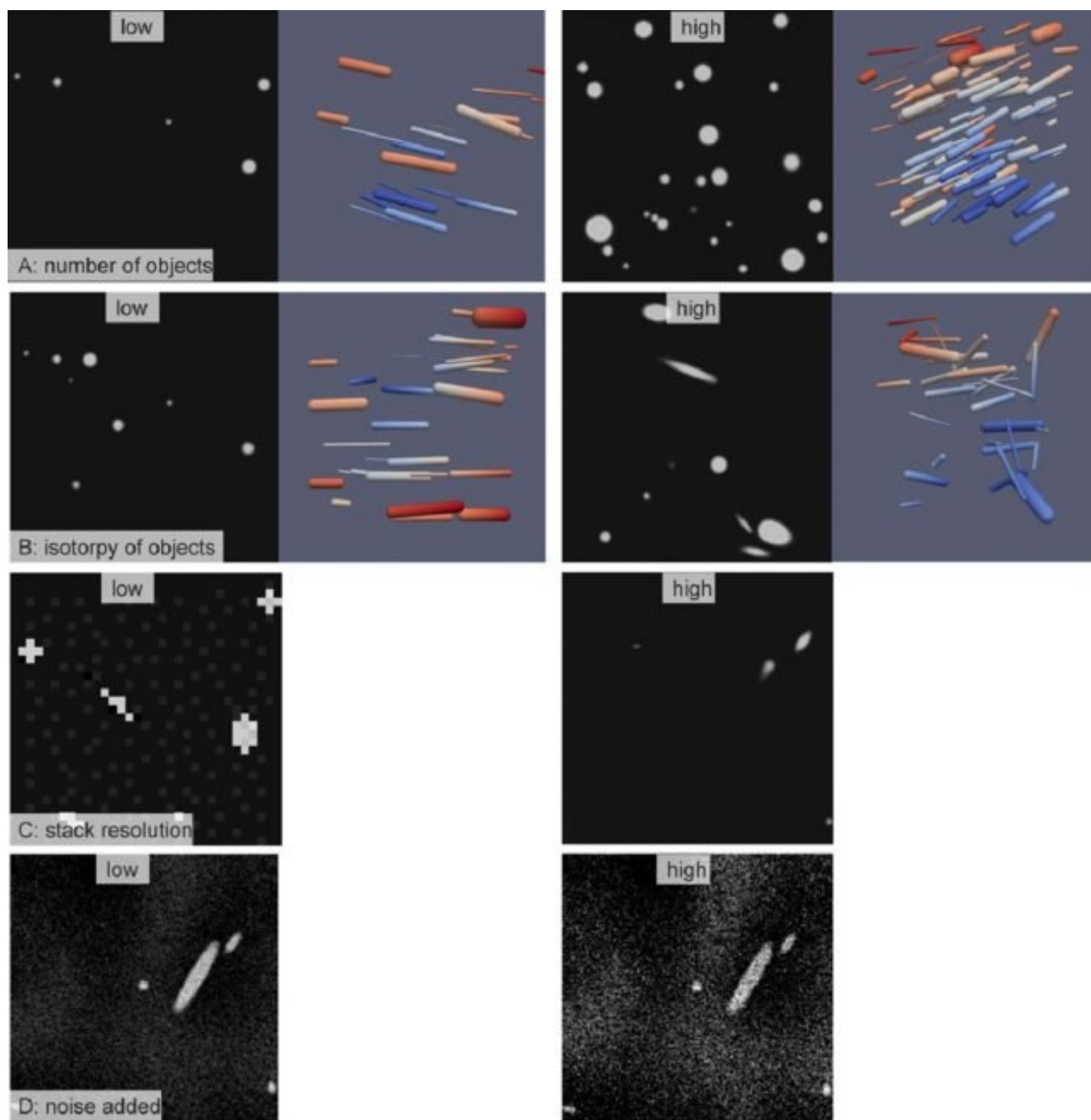
Hlavní cíle práce:

- vytvoření programu generujícího virtuální datasety 3D objektů o známých prostorových parametrech;
- hodnocení výsledků 3D analýzy vygenerovaných datasetů, hodnocení přesnosti analýzy a návrhy její optimalizace;
- identifikace rizikových situací, kde 3D analýza může selhávat.

Generace datasetů s 3D objekty byla optimalizována pomocí základních parametrů primitivních izolovaných 3D objektů. Pokud obsahuje dataset jediný objekt, např. krychli, pak hodnoty jejího objemu a povrchu by měly být bez významných odchylek mezi zadanými a analýzou dosaženými hodnotami. Po této optimalizaci tedy lze předpokládat, že pokud je u komplexní struktury (například kolidující válce) nalezen rozdíl mezi zadanými parametry a výsledky 3D analýzy, lze jej vysvětlit vlivem modifikace obrazu (např. binarizace). Dále lze například testovat, zda se u datasetu se stejnými objekty liší dosažené výsledky na základě orientace objektů (rozdílná isotropie).

Jako vhodný příklad pro ilustraci problematiky představujeme zdánlivě triviální parametr „počet objektů“, kdy uvažujeme vygenerování třiceti objektů o stanovených parametrech s náhodným umístěním a orientací. Změna počtu objektů může být ve smyslu plus i minus a oba vlivy se mohou kombinovat.

- snížení počtu objektů:
 - o spojení diskrétních objektů při binarizaci (viz obr.8);
 - o eliminace objektů při nevhodném thresholdingu;
 - o eliminace relativně malých objektů při image processingu (např. redukce šumu).
- navýšení počtu objektů:
 - o binarizace a neodstranění částic obrazového šumu;
 - o fragmentace jednoho objektu do více objektů při binarizaci (viz níže);



Obr. 14: Ukázka vygenerovaného datasetu s různými hodnotami zadaných parametrů (vlevo nízké hodnoty, vpravo vysoké): A) počet objektů; B) isotropie; C) rozlišení; D) obrazový šum. Ilustrace z uvedené publikace.

Na základě analýz lze uvést následující problémy, které při 3D analýze mikro-CT dat vznikají:

- postupný přechod mezi pozadím a objektem – problém stanovení hranice;
- přítomnost šumu, který interaguje s objektem/pozadím:
 - o snaha o eliminaci může redukovat objem/povrch objektů;
 - o binarizace šumových pixelů vede k výraznému nárůstu počtu objektů;
 - o ovlivnění tvaru objektů;
 - o vznik spojení diskrétních objektů,
- binarizace pomocí 2D postupů může vést u relativně tenkých objektů téměř paralelních s rovinou, ve které je provedena binarizace, k fragmentaci objektu do více částí; tím se může významně zvýšit počet objektů;
- významné odchylky v hodnotách stanovených parametrů vznikaly, pokud velikost pixelu byla více než 1/10 typické velikosti objektu – toto je významné pro hodnocení větvících se struktur.

Programem byla vytvořena sada celkem čtyřiceti datasetů s různými parametry (počet objektů, délková hustota, povrchová hustota, objemová hustota; viz obr. 14). Jako proměnné byly zvoleny hodnoty (dále proměnné): počet objektů, isotropie, rozlišení, šum. Nízké rozlišení simuluje biologicky velice častou situaci, kdy je přítomna větvící se struktura (např. cévy), jejíž terminální části jsou již pod detekční úrovní zobrazovací metody.

Z výsledků vyplývá, že proměnné počet objektů ani jejich orientace (isotropie) nemá vliv na dosažené výsledky 3D analýzy. Parametr počet objektů byla většinou mikro-CT analýzou podhodnocena (většinou do 5%). Ostatní parametry byly naopak nadhodnoceny: objemová hustota (do 10%), délková hustota (do 15%) a povrchová hustota (do cca 17%). V případě proměnné obrazový šum a rozlišení byly do určitého stupně hodnoty poměrně přesné, po jeho překročení však začala chyba výrazně narůstat. V případě šumu byla chyba po několik stupňů udržována modifikací image processingu. V případě proměnné rozlišení začala chyba výrazně narůstat poté, co velikost voxelu přesáhla 1/10 průměru typického objektu v datasetu. Chyba se nejvíce projevila u parametru počet objektů, kdy narůstala až na hodnotu 250% při odchylkách ostatních parametrů do cca 30%. Z pohledu možné chyby je tedy riziková kombinace relativně nízkého rozlišení s ohledem na strukturu vzorku a obrazového šumu. Obecně jsou přesnější dosažené hodnoty objemu než povrchu.

Hodnocení jednotlivých proměnných vyžadovalo určité modifikace postupu analýzy. Vytvoření univerzálního postupu u testovaných dat nebylo výhodné, protože např. střední intenzita redukce šumu zbytečně ovlivňovala datasety s nízkým šumem a naopak nedostatečně působila v datasetech s vysokým šumem.

Závěrem lze uvést, že pro účely této práce byl vyvinut volně dostupný program TelGen, který umožňuje generovat virtuální mikro-CT datasety použitelné ke kalibraci 3D analýzy. Pomocí tohoto programu mohou mikro-CT uživatelé sami provést analýzu datasetů s různým nastavením parametrů a tím studovat vlivy různých operací na výsledky a také hodnotit vzniklé nepřesnosti. Optimálně mohou testovat datasety podobné reálné situaci (např. částicové či vlákenné materiály) a tyto poznatky při analýze aplikovat. Kalibrace a validace mikro-CT dat je stále aktuálním problémem. Je velice zajímavou otázkou, jak bude tato situace řešena v budoucnu, pokud bude možné vytvořit reálné kalibrační fantomy komplexních struktur.

Využití mikro-CT v rámci projektu:

- zajištění studijních dat, které byly podkladem pro přípravu programu TelGen;
- pilotní hodnocení generovaných datasetů umožňující kalibraci programu;
- 3D analýza generovaných datasetů, která umožnila hodnotit přesnost analýzy a vliv různých parametrů.

4.1.3 Srovnání hodnocení struktury kostní tkáně pomocí mikro-CT a histologie

Komentář k publikaci: **Comparison of ground sections, paraffin sections and micro-CT imaging of bone from the epiphysis of the porcine femur for quantitative histological evaluation**

Kubíková T., Bartoš M., Juhás Š., Suchý T., Sauerová P., Hubálek Kalbáčová M., Tonar Z.

Annals of Anatomy (2018) 220:85-96

doi: 10.1016/j.aanat.2018.07.004

IF= 1,852

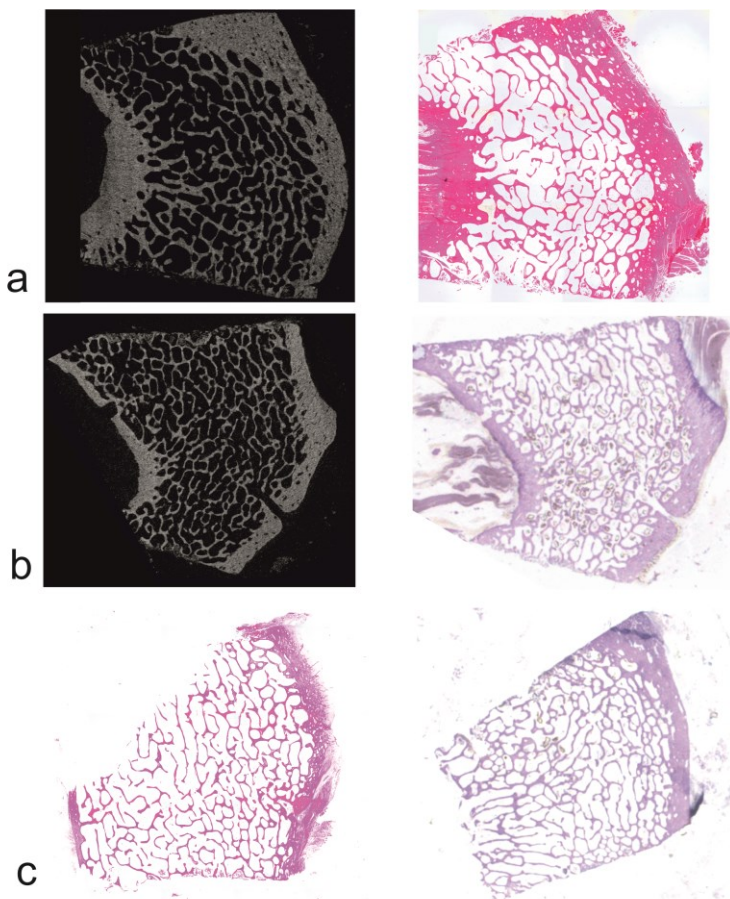
Hodnocení struktury kostní tkáně je zásadní pro mnoho oblastí výzkumu. Jako příklady lze uvést studium kostních onemocnění a jejich terapeutické ovlivnění či průběh kostního hojení s možnou aplikací biomateriálů. Konvenční přístup představuje histomorfometrie, kdy je kostní tkáň hodnocena na základě histologických řezů pomocí stereologických postupů, přičemž existují 2 základní varianty: kostní výbrusy a dekalciфикované řezy. V posledních dvou dekáдах se v rámci kostního výzkumu významně uplatňuje mikro-CT, které má řadu výhod a pro hodnocení mnoha parametrů může konvenční postupy nahradit. V řadě prací je současně užito mikro-CT a histomorfometrie, kdy je většinou nacházena dostatečná shoda

mezi oběma metodami. Studie, která by hodnotila současně všechny tyto tři metody, nám však nebyla a není známa.

Hlavní cíle práce:

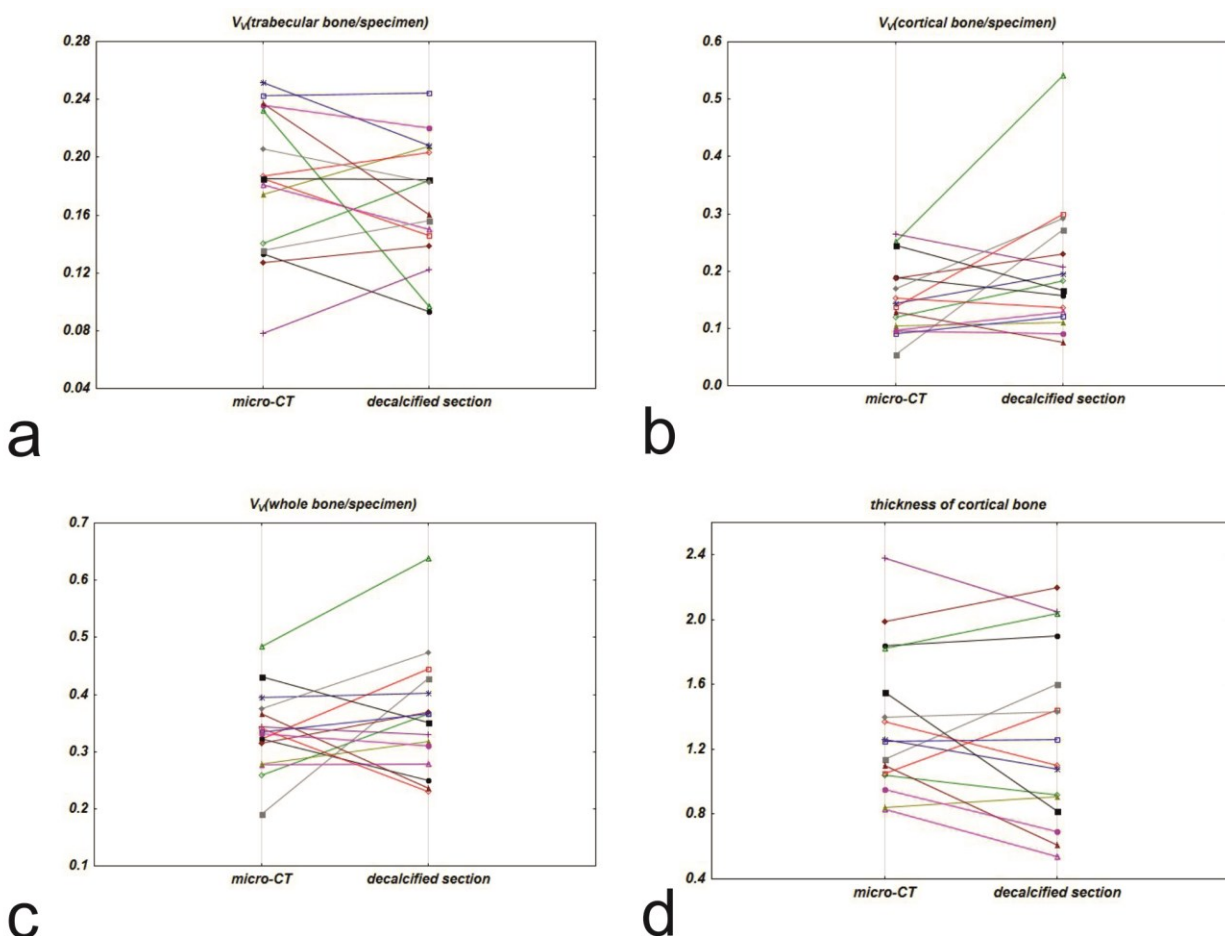
- porovnat hodnoty strukturních parametrů kostní tkáně dosažené pomocí mikro-CT a histologického zpracování za užití 2 metod: výbrusy a dekalcifikované řezy
- popsat biologickou variabilitu struktury kostní tkáně prasete v oblasti *trochanter major femoris*, a to s ohledem na její časté využití v rámci experimentů zaměřených na kostní hojení

V rámci studie bylo postmortálně připraveno patnáct kostních bločků z oblasti *trochanter major femoris* prasete. Jednalo se o intaktní femury experimentálních zvířat z jiné studie, jež nebyla zaměřena na kostní biologii. Hodnocené parametry představovaly: procentuální objem trabekulární kostní tkáně ve vzorku, procentuální objem kortikální kostní tkáně ve vzorku, procentuální objem kostní tkáně ve vzorku, tloušťka kortikální kosti. Všechny vzorky byly mikro-CT naskenovány a analyzovány. Dále byla první polovina vzorků hodnocena pomocí výbrusů (z jednoho vzorku byly připraveny dva řezy), druhá pomocí dekalcifikovaných řezů (z jednoho vzorku byly připraveny tři řezy; viz obr. 15). Výsledky byly porovnány.



Obr. 15: Porovnání mikro-CT zobrazení a histologického preparátu: A) mikro-CT a dekalcifikovaný řez; zdánlivě vyšší tloušťka kortikální kosti je působena přítomností měkkých tkání na povrchu kosti (periost a vazivo); B) mikro-CT a výbrus; C) dekalcifikovaný řez a výbrus. Zobrazení A a B ukazuje stejný vzorek v podobné rovině řezu. Měřítka = 2 mm. Ilustrace z uvedené publikace.

Mezi hodnotami mikro-CT a histologickými nebyly nalezeny signifikantní rozdíly (viz obr. 16). Vyšší korelace byla pozorována mezi mikro-CT a výbrusy. Při porovnání hodnot výbrusů a dekalcifikovaných řezů byly nalezeny signifikantní rozdíly mezi procentuálním objemem kostní tkáně ve vzorku a procentuálním objemem kortikální kostní tkáně ve vzorku. Je však nutné uvažovat, že již nejde o srovnání identických vzorků, jak tomu bylo při porovnávání s mikro-CT.



Obr. 16: Příklad párového porovnání hodnot mikro-CT a dekalcifikovaných řezů uvedených parametrů: A) procentuální objem trabekulární kosti ve vzorku; B) procentuální objem kortikální kosti ve vzorku; C) procentuální objem kostní tkáně ve vzorku; D) tloušťka kortikální kosti v mm. Ilustrace z uvedené publikace.

Jednotlivé metody mají své výhody i nevýhody. Dekalcifikované řezy umožňují hodnocení přítomných buněk i osteoidu a také aplikaci imunohistochemických metod. Problematické je hodnocení v přítomnosti kovového implantátu, kdy je výhodné využití výbrusů. Obě metody jsou limitovány omezeným počtem 2D řezů (kdy nemáme informaci o celém vzorku) a časovou náročností. V důsledku přípravy řezů mohou snadno vznikat artefakty a defekty vzorku. Výhody mikro-CT představuje nedestruktivita, hodnocení

celého vzorku, využití přímé 3D analýzy (tedy bez užití 2D hodnocení) a časová efektivita. Je možná analýza jak nativní kostní tkáně, tak implantovaného materiálu (např. kovový implantát), avšak jen v případě vhodného RTG kontrastu (např. titan, naopak ocelový materiál je nehodnotitelný). V důsledku nedestruktivity je vzorek zachován a může být využit k dalším analýzám. Nevýhoda mikro-CT je pochopitelně nižší rozlišení, což neumožňuje hodnotit kostní buňky či nekontrastní osteoid. Vizualizace osteoidu pomocí mikro-CT byla v projektu pilotně testována, avšak neúspěšně. Kontrastní látka (PTA) silně kontrastovala též kostní dřev, což negativně ovlivňovalo segmentaci kostní tkáně před analýzou.

Obě histologické metody dobře korelovaly s hodnotami dosaženými pomocí mikro-CT. Toto podporuje využití mikro-CT při analýze těchto základních parametrů místo konvenčních postupů, jež jsou pracné a časově náročné. Zároveň bylo potvrzeno, že evaluace uvedených parametrů na základě dvou až tří řezů odpovídá hodnotám, jež jsou získány při analýze celého kostního vzorku pomocí mikro-CT. Je však nutné zdůraznit, že v případě nehomogenní struktury kostní tkáně (např. výzkum hojení kostních defektů) lze očekávat, že nepřesnosti způsobené limitací na několik málo řezů vzorkem mohou být zásadní. Mikro-CT umožňuje analýzu mnoha dalších 3D parametrů (např. otevřená a uzavřená porozita). Zároveň byla touto prací popsána kostní struktura a její variabilita v oblasti velkého trochanteru prasete, jež může být užita jako reference ve studiích, jež danou oblast použijí pro experimenty.

Využití mikro-CT v rámci projektu:

- skenování všech hodnocených vzorků
- příprava 2D a 3D vizualizací
- 3D analýzy struktury hodnocených vzorků

4.2 Mikro-CT tkáňových nosičů

4.2.1 Charakterizace a testování PLA tkáňových nosičů připravených 3D tiskem

Komentář k publikaci: **Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer.**

Gregor A., Filová E., Novák M., Kronek J., Chlup H., Buzgo M., Blahnová V., Lukášová V., Bartoš M., Nečas A., Hošek J.

Journal of Biological Engineering (2017) 11:31

doi:10.1186/s13036-017-0074-3

IF=5.256

3D tisk v současné době představuje významnou metodu přípravy tkáňových nosičů pro účely tkáňového inženýrství. Hlavní předností je vysoká míra kontroly nad výsledným produktem, s možností vytvoření cílené struktury a její optimalizace. Tento článek shrnuje projekt, jehož cílem bylo posoudit použitelnost komerčně dostupných 3D tiskáren (s cenou do 1000 EUR) s využitím běžně dostupných materiálů (polylaktid) pro přípravu tkáňového nosiče, určeného ke kostní regeneraci, který by byl potenciálně klinicky aplikovatelný.

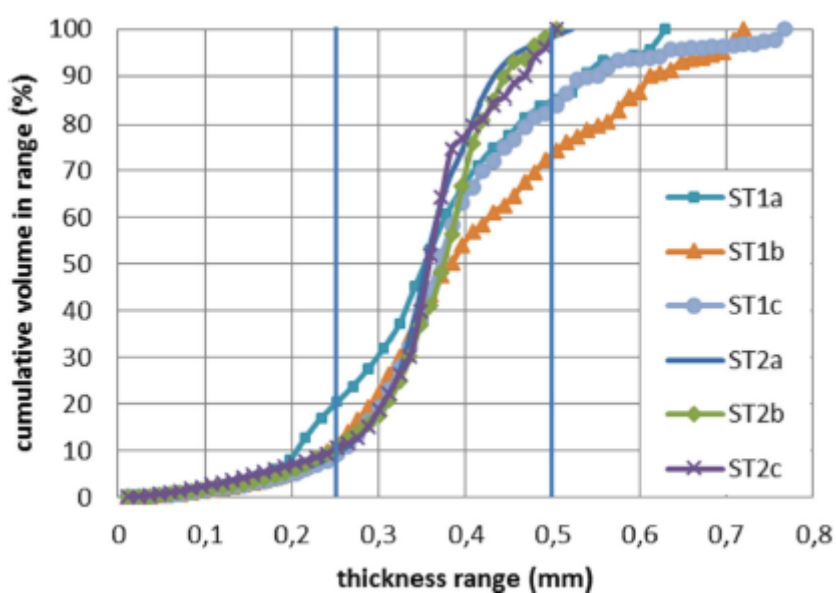
Hlavní cíle:

- posoudit možnost přípravy klinicky použitelných tkáňových nosičů komerčně dostupnými 3D tiskárnami s použitím běžně dostupného materiálu;
- vyhodnotit jejich mechanické vlastnosti a interakci s buňkami.

Dva typy vzorků lišící se uspořádáním a porozitou byly naskenovány pomocí mikro-CT. Rozdíl spočíval ve vzdálenosti jednotlivých vláken scaffoldu, kdy jedna varianta obsahovala při pohledu shora prázdné prostory. S ohledem na osazování buněk na horní plochu se předpokládalo, že toto uspořádání bude mít vliv na interakci s buňkami a jejich proliferaci. Rozlišení tisku bylo v této skupině tiskáren 0,35 mm, což umožňuje vytvoření makroporozity o podobné hodnotě, která je v souladu s doporučenými hodnotami řady studií (jak však bylo uvedeno v 4.1.1, mnoho prací uvádí i jiná doporučení). Testovaná celková porozita představovala hodnoty 30 % a 50 %. Doba přípravy sady čtyř scaffoldů byla přibližně patnáct minut.

Struktura scaffoldů byla charakterizována (výpočet porozity, SEM, mikro-CT), přičemž poměrně přesně odpovídala definovaným parametrům, odchylky byly většinou pouze několik procent. Průměrná hodnota

tloušťky vlákna (dle tisku 0,35mm) byla 0,37 mm (obr. 17). Rozptyl této hodnoty je dán přítomností tenkých vláken, které vznikají jako defekty při přesunu tiskové trysky a dále oblastmi kontaktu se sousedními vlákny, kde v některých oblastech dochází k rozsáhlejšímu spojení, které je při výpočtu hodnoceno jako jedna struktura. Mikro-CT odhalilo minimální přítomnost uzavřené porozity (pod 0,1 %). SEM i mikro-CT byly schopné detekovat defekty struktury a její nepravidelnosti (např. přítomnost tenkého vlákna, vzniklého při přesunu tiskové trysky). Tloušťka materiálu se místy lišila (hodnoceno mikro-CT). Polylaktid byl testován pomocí FTIR-IR (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací) na chemické složení, které potvrdilo přítomnost PLA bez významné kontaminace. Dále byly u PLA hodnoceny jeho povrchové vlastnosti (např. kontaktní úhel, který prokázal mírnou hydrofilii) a cytotoxicita, která nebyla prokázána. Buňky osteosarkomové linie byly nasazeny na oba typy nosičů a poté studovány (adheze, proliferace, metabolická aktivita, osteogenní diferenciaci aj.) bez nálezů významných odlišností mezi scaffoldy. Mechanické testy prokázaly signifikantní zhoršení mechanických vlastností u tkáňového nosiče s vyšší porozitou.



Obr. 17: Hodnocení tloušťky tištěných vláken tkáňového nosiče pomocí kumulativní křivky. Vpravo jsou uvedeny varianty vzorků ST1 a ST2. Ilustrace z uvedené publikace.

Závěrem práce je potvrzení, že lze připravit pomocí běžně dostupné 3D tiskárny a běžného materiálu (PLA) tkáňový nosič, který je potenciálně aplikovatelný v kostní tkáňové regeneraci. V rámci provedených testů dosahovaly varianty s 30% a 50% celkovou porozitou podobných výsledků, kromě mechanických vlastností. Toto zjištění je příznivé, neboť možnost redukce porozity by znamenala zlepšení mechanických vlastností, které mohou limitovat aplikaci materiálu. Celková porozita odpovídala nastavené porozitě (odchylky v řádu několika procent). Pomocí mikro-CT byla vyloučena významná přítomnost uzavřených pórů, které by mohla významně zhoršit mechanické vlastnosti a tím ohrozit stabilitu struktury.

Využití mikro-CT v rámci projektu:

- charakterizace připravených scaffoldů a posouzení shody se zadanými parametry 3D tisku

Limitace této práce představuje omezené spektrum struktury tkáňových nosičů, které bylo testováno. S ohledem na omezené rozlišení tisku nebyl testován doporučovaný standard s porozitou 90 %. Počet vzorků nepostačuje pro jednoznačné potvrzení spolehlivosti takto připraveného materiálu, tedy zhodnocení četnosti přítomnosti závažných strukturních defektů, což však nebylo cílem práce. Hodnocení bylo prozatím provedeno v *in-vitro* podmínkách, které nemusí odpovídat reálné *in-vivo* situaci. Otázka rychlosti degradace materiálu u připraveného nosiče by musela být více prozkoumána před *in-vivo* aplikací s ohledem na rozpadové produkty a jejich lokální efekt (kyselina mléčná).

4.2.2 Změny kolagenových tkáňových nosičů v důsledku hydratace

Komentář k publikaci: **Dry versus hydrated collagen scaffolds: are dry states representative of hydrated states?**

Suchý T., Šupová M, Bartoš M., Sedláček R., Piola M., Soncini M., Fiore G.B., Sauerová P., Hubálek Kalbáčová M.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine (2018) 29:20

doi: 10.1007/s10856-017-6024-2

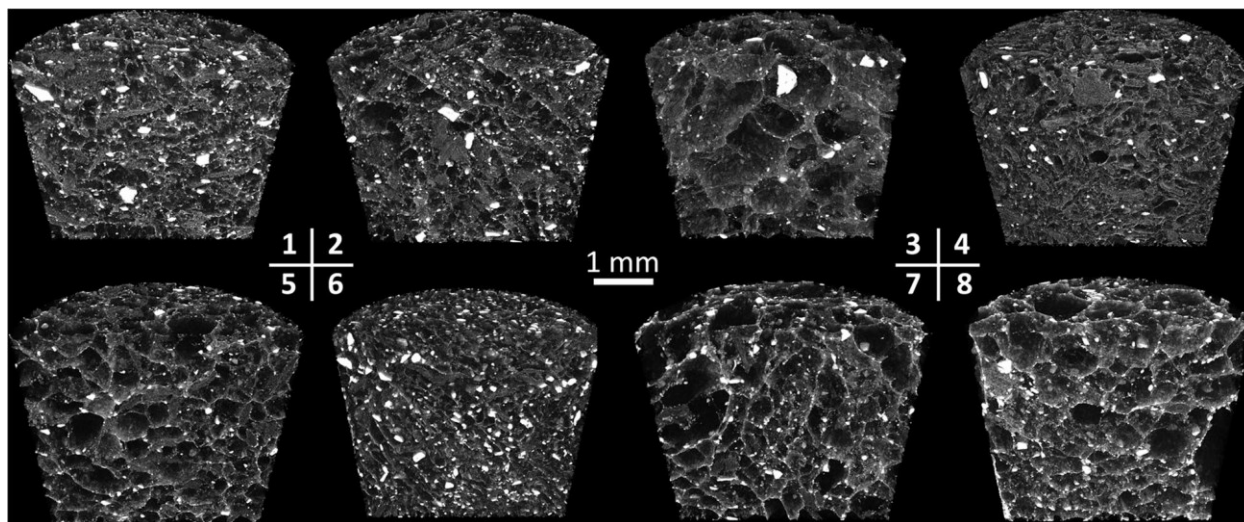
IF = 2,448

Kompozitní tkáňové nosiče na bázi kolagenu jsou často zkoumány jako perspektivní z pohledu tkáňového inženýrství. Materiály, které jsou použity, jsou často hydrofilní, což je výhodné pro interakci s buňkami. Mnoho studií však neuvažuje změny působené hydratací materiálu, a to v důsledku např. přidání biologicky aktivních látek, osazení buňkami (cell-seeding) či implantace do tkáňového defektu. Hydratace může vést k bobtnání materiálu a ovlivňovat vlastnosti scaffoldů, které mohou být v důsledku jiné než předpokládané a tím limitovat jejich aplikaci. Tímto tématem se dosud zabývalo pouze několik studií. Varley a kol. hodnotil vliv hydratace na mechanické vlastnosti kolagenových scaffoldů a jejich strukturu, přičemž popisují nárůst velikosti pórů a redukci interkonektivity (hodnoceno konfokální mikroskopií; Varley M.C. et al., 2016). Offeddu a kol. pozoroval při hydrataci konstantní velikost pórů, avšak redukci jejich vzájemného propojení, která ovlivňovala permeabilitu materiálu (hodnoceno pomocí mikro-CT; Offeddu G.S. et al., 2016).

Hlavní cíle:

- posoudit změnu struktury tkáňových nosičů v důsledku hydratace, která lépe odpovídá reálným podmínkám po implantaci do tkáňového defektu;
- vytvořit metodiku mikro-CT skenování hydratovaných tkáňových nosičů;
- vyhodnotit mechanické vlastnosti nosičů před a po hydrataci;
- ověřit vliv složení kompozitního nosiče na výše uvedené vlastnosti.

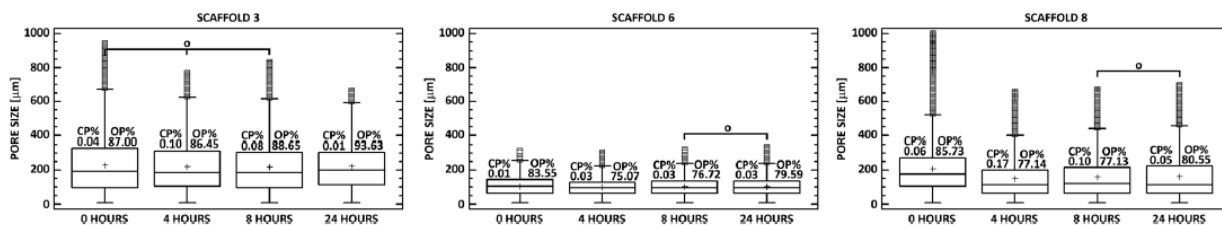
V rámci studie bylo připraveno osm typů scaffoldů s proměnlivým zastoupením hlavních složek (kolagen I, polylaktid, nanočástice kalciumfosfátu, hyaluronan sodný; obr. 18). Smícháním složek vznikla disperze, která byla zamrazena a následně lyofilizována. Vzniklé vzorky byly pomocí mikro-CT charakterizovány. Technicky se jedná o komplikovanější proces ve srovnání se skenováním suchých vzorků. Médium, ve kterém je vzorek *in-vitro* hydratován (fyziologický roztok, PBS aj.) má vyšší RTG densitu než vzduch, což vede k relativnímu snížení denzity scaffoldu, která je již primárně často nízká. Bylo proto nezbytné provést RTG kontrastování vzorku. Hydratovaný scaffold zároveň může být prostorově nestabilní a vznikající pohyb může vést ke vzniku artefaktů. Sken je tedy kompromisem mezi limitovanou dobou skenu, RTG kontrastem tkáňového nosiče a požadovaným rozlišením. Vzorky byly skenovány uzavřené ve zkumavce po hydrataci, perfuzi Lugolovým roztokem (zajištění RTG kontrastu) a jeho propláchnutím destilovanou vodou. Skeny proběhly v definovaných časových intervalech od iniciální hydratace (4, 8, 24 hod) a doba skenování jednoho vzorku byla ~1 hodina.



Obr. 18: Mikro-CT 3D vizualizace osmi typů tkáňových nosičů. Ilustrace z uvedené publikace.

Získaná obrazová data byla rekonstruována, vizualizována a pomocí 3D postupů analyzována. Jako základní parametry byly určeny velikost póru, otevřená a uzavřená porozita. Otevřená porozita dosahovala vysokých hodnot, a to cca 82-87 %. Uzavřená porozita byla minimální, pod 0,1 %. Hodnocení

struktury po hydrataci proběhlo u tří typů vzorků (zástupci různých hodnot velikosti pórů; obr. 19), přičemž u žádného zkoumaného vzorku nebyly pozorovány významné strukturní změny.



Obr. 19: Hodnoty porozity u tří typů scaffoldů po hydrataci v určitých časových intervalech (0 – suchý stav; 4, 8 a 24 hodin po hydrataci); OP – open porosity; Pore size – velikost póru. Rozdíly jsou signifikantní ($p \leq 0,05$) kromě hodnot označených °. Ilustrace z uvedené publikace.

Ostatní parametry byly hodnoceny po delší časový interval (až 576 hodin). U suchých i hydratovaných vzorků byly provedeny mechanické testy. V důsledku hydratace vzorků došlo k poklesu modulu pružnosti v prvních 24 hodinách (až na cca 1%), další hydratace nevedla k významným změnám. Byla hodnocena permeabilita, při které jednotlivé typy vzorků nevykazovaly významné změny.

Využití mikro-CT v rámci projektu:

- charakterizace struktury kompozitních tkáňových nosičů;
- vytvoření a uvedení metodiky RTG kontrastování a mikro-CT skenování hydratovaných vzorků;
- vyhodnocení struktury v průběhu hydratace v určitých časových intervalech.

Závěrem lze konstatovat, že složení testovaných scaffoldů nemělo na většinu parametrů významný vliv. Hydratace nevedla k podstatným změnám strukturních parametrů a permeability. Předpokládaný nárůst uzavřené porozity (v důsledku uzavírání komunikací mezi póry bobtnáním materiálu) nebyl pozorován. Mechanické vlastnosti byly hydratací významně ovlivněny u všech typů nosičů. Limitace užití mikro-CT souvisí nejvíce s technickými komplikacemi, které jsou dále uvedeny. Nízká RTG denzita hydratovaného scaffoldu vyžaduje kontrastování. Nepředpokládá se, že by tento proces ovlivňoval strukturu nosiče, avšak vyloučit tento vliv nelze. V průběhu času dochází k uvolňování RTG kontrastní látky ze scaffoldu do média, ve kterém je vzorek inkubován. Tím je snížena RTG denzita scaffoldu a zároveň se zvyšuje kontrast pozadí. Z tohoto důvodu bylo hodnocení omezeno na 24 hodin, protože v delších intervalech, které jsme pilotně testovali, se kontrast nosiče snižoval (mírně již po 48 hodinách, znatelně po sedmi a více dnech). Struktura hydratovaného nosiče je mechanicky méně odolná, jak bylo ve studii potvrzeno, a proto náchylnější k pohybovým artefaktům, které vznikaly při déletrvajících skenech. Z těchto důvodů byl nalezen kompromis mezi skenovacími parametry (velikost pixelu a průměrování snímku) a skenovacím časem, který byl ~1 hodina.

4.2.3 Charakterizace 3D struktury kostních tkáňových nosičů připravovaných pro osazování buňkami

Komentář k publikaci: **Positive impact of dynamic seeding of mesenchymal stem cells on bone-like biodegradable scaffolds with increased content of calcium phosphate nanoparticles**

Sauerová P., Suchý T., Šupová M., Bartoš M., Klíma J., Juhásová J., Juhás Š., Kubíková T., Tonar Z., Sedláček R., Piola M., Fiore G.B., Soncini M., Hubálek Kalbáčová M.

Molecular Biology Reports (2019) 46:4483-4500

doi: 10.1007/s11033-019-04903-7

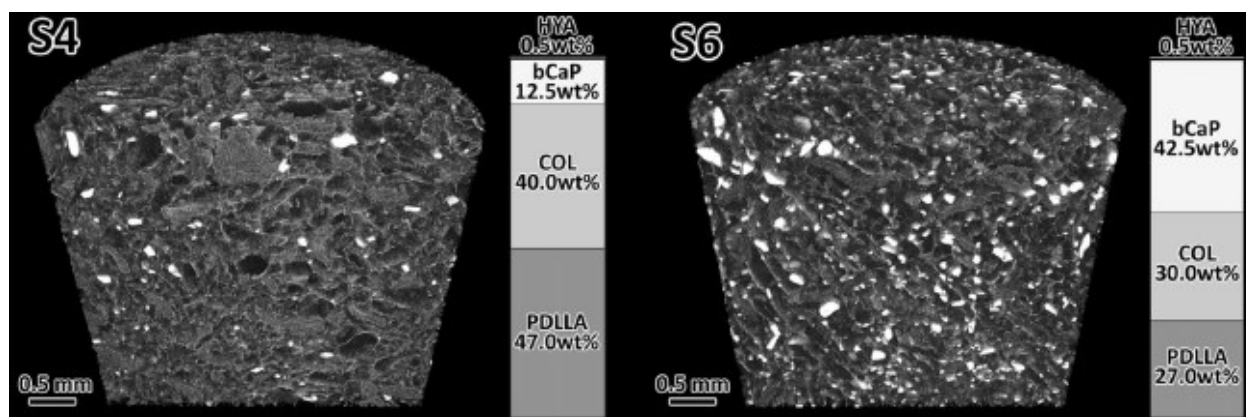
IF= 1.889

Jedním z konceptů tkáňové regenerace je aplikace buněk na tkáňový nosič před jeho implantací. V rámci této studie byly vyvinuty a *in-vitro* charakterizovány a testovány tkáňové nosiče, na kterých byla dále porovnávána statická a dynamická kultivace buněk. Druhá uvedená metoda je založena na kontinuální perfuzi biomateriálů tekutým médiem, takže podporuje výměnu živin a odpadních látek a proto více odpovídá reálným podmínkám a představuje perspektivní možnost osazování biomateriálů buňkami. Celkem byly testovány dva typy nosičů, které se lišily složením (poměr kolagenu, polylaktidu a kalciumfosfátu). Tato práce navazuje na výše uvedenou studii publikovanou jako „Dry versus hydrated collagen scaffolds: are dry states representative of hydrated states?“ (Suchý T. et al., 2018).

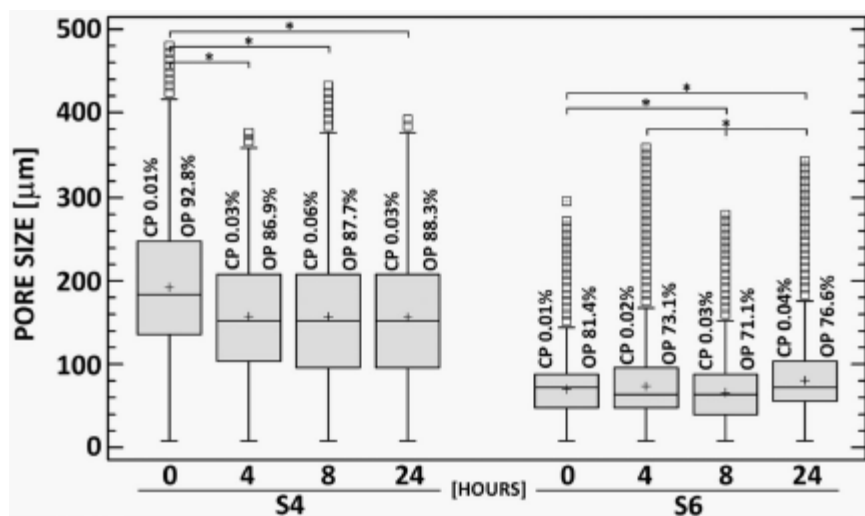
Hlavní cíle:

- *in-vitro* charakterizace kompozitních porézních tkáňových nosičů pro kostní aplikaci;
- porovnání efektivity dvou typů osazování nosičů MSC buňkami.

3D struktura tkáňových nosičů byla charakterizována pomocí mikro-CT a hlavními hodnocenými parametry byla porozita. Struktura suchých vzorků se lišila porozitou a velikostí pórů (obr. 20). Nosiče byly hodnoceny jak v suchém, tak hydratovaném stavu, a to podle protokolu popsáném v předešlé publikaci (Suchý T. et al., 2018).



Obr. 20: Mikro-CT 3D zobrazení tkáňových nosičů (vzorek S4 a S6) a uvedené jejich složení (bCaP – kalcium fosfát, COL – kolagen I, PDLLA – polylaktidová kyselina). Měřítka = 0,5 mm. Ilustrace z uvedené publikace.



Obr. 21: Hodnoty porozity u tří typů scaffoldů po hydrataci v určitých časových intervalech (0 – suchý stav; 4, 8 a 24 hodin po hydrataci); OP – open porosity. Pore size – velikost póru. Statisticky signifikantní rozdíly ($p \leq 0,05$) jsou označeny *. Ilustrace z uvedené publikace.

Při hodnocení efektivity osazování nosiče buňkami bylo hodnoceno jejich množství, distribuce, hloubka penetrace, enzymatická aktivita a genová exprese. Nejprůznivější výsledky byly pozorovány při kombinaci nosiče S6 (vysoký obsahem kalciumfosfátu, menší velikost pórů) s dynamickou kultivací. Vysvětlením by mohla být dobrá adheze buněk na částice hydroxyapatitu a větší mechanická odolnost nosiče, jež umožnila efektivnější dynamický cell-seeding. Úspěšnější osazení buňkami může vést ke zlepšení procesu hojení, a to jak možností diferenciaci osazených buněk do požadovaných typů, tak jejich významem pro produkci signálních látek.

Optimální variantou hodnocení v této studii by bylo stanovit počet a distribuci buněk v celém vzorku ve 3D. Z těchto důvodů byly provedeny pilotní studie, které měly za cíl vizualizovat buňky na tkáňovém nosiči pomocí mikro-CT. Jako kontrastní látky byl použit Lugolův roztok, fosfowolframová kyselina

a také nanočástice Ag. Ani při nejlepším dosažitelném rozlišení (skenována s pixel size 0,35 μm) však nedošlo k uspokojivým výsledkům, které by spolehlivě umožnily detekci jednotlivých buněk. Zachycený obraz nebyl jednoznačný. Bylo problematické rozhodnout, zda se jedná o kontrastované buňky, obrazový šum či o drobné částice hydroxyapatitu. V minulém roce byla publikována práce, která distribuci buněk na tkáňovém nosiči popisovala pomocí mikro-CT (Shepherd D.V. et al., 2018). Situace zde byla zjednodušena použitím pouze kolagenového scaffoldu bez jiných složek. Jako kontrastní látka byl užit síran barnatý. Úspěšné vizualizace buněk na tkáňovém nosiči dosáhl tým Lucy Vojtové, který hodnotil buňky na kolagenovém scaffoldu pomocí nano-CT (Vojtová L. et al., 2019).

Využití mikro-CT v rámci projektu:

- charakterizace struktury kompozitních tkáňových nosičů;
- pilotní hodnocení přítomnosti buněk na tkáňovém nosiči.

4.2.4 Stručné shrnutí mikro-CT při hodnocení tkáňových nosičů

Komentář k publikaci: **Micro-CT in tissue engineering scaffolds designed for bone regeneration: principles and application.**

Bartoš M., Suchý T., Tonar Z., Foltán R., Hubálek Kalbáčová M..

Ceramics-silikaty (2018) 62, (2) 194 - 199

doi: 10.13168/cs.2018.0012

IF= 0,680

Mikro-CT je již standardně používanou metodou charakterizace tkáňových nosičů pro kostní tkáňové inženýrství. Spektrum možné aplikace je velice široké a zahrnuje hodnocení v *in-vitro*, *in-vivo* a *ex-vivo* podmínkách. Kromě mnoha výhod (nedestruktivita, přímá 3D analýza, možnost vizualizace a kvantifikace struktury) má samozřejmě také určité limitace (rozlišení, nutnost RTG kontrastu aj.). Prezentovaná práce je mini-review, zaměřené na tuto problematiku.

Tkáňové nosiče pro kostní regeneraci jsou velice často porézní a biodegradovatelné. Jejich aplikací do kostního defektu by měla být vytvořena matrice, které bude podporovat hojení, vaskularizaci, migraci buněk do scaffoldu, jejich diferenci a produkci extracelulární matrix. Degradace materiálu musí odpovídat novotvorbě tkáně. Předpokládá se, že struktura má významný vliv na tyto děje. Konvenční postupy charakterizace zahrnuje např. mikroskopie (světelná, konfokální, elektronová). Mikro-CT je výhodnou alternativou. Kvalita získaných dat závisí na typu vzorku, nastavení parametrů skenování a následné rekonstrukce, vlivu artefaktů a modifikaci obrazu (image-processing), s cílem např. redukovat šum nebo

vybrat oblast zájmu. Všechny tyto kroky mohou významně ovlivnit výsledky. Skenování tkáňových nosičů přináší v řadě případů specifické problémy: nízká RTG denzita, kombinace různě denzních materiálů u kompozitních nosičů nebo po implantaci. Mikro-CT je s výhodou aplikovatelné v rámci charakterizace připravovaných vzorků, umožňující zpětnovazebnou kontrolu výstupů a modifikaci přípravy.

V rámci *in-vitro* testování lze hodnotit vliv mechanického zatížení na strukturu, změny po hydrataci (většinou s nutností RTG kontrastování vzorku) či osazení buněk. Struktura nosiče také může být využita k matematickým modelacím, např. simulace zatížení či prostupu tekutiny. *Ex-vivo* aplikace se týká hodnocení explantovaných vzorků po *in-vivo* pokusu. Mikro-CT umožňuje hodnotit degradaci tkáňového nosiče, reakci okolní tkáně a novotvořenou kost, pokud je dostatečně mineralizována k poskytnutí RTG kontrastu. Skenovací čas není primárně limitován charakterem vzorku (oproti *in-vivo*), takže je možné dosahovat vysoké kvality skenu a rozlišení. Významnou výhodou je 3D vizualizace vzorku před histologickým hodnocením, které umožňuje dosáhnout požadované orientace histologických řezů. *In-vivo* aplikace využívá speciálního typu přístrojů (*in-vivo* mikro-CT skenery), které umožňují skenování živých experimentálních zvířat. Tento typ skenování významně přispěl k rozvoji a rozšíření této metody, protože umožnil rychlou a přesnou fenotypizaci experimentálních zvířat v rámci přípravy modelů různých onemocnění (genetické modifikace), studium průběhu nemoci (nádorová onemocnění, šíření metastáz, rozvoj vaskularizace nádorů aj.) a hodnocení efektu terapeutických intervencí (aplikace farmak). Obecně mají tyto přístroje nižší rozlišení, sken probíhá výrazně rychleji. Protože je možné zvířata skenovat opakovaně, je možné redukovat jejich počet oproti konvenčním postupům. Pomocí speciálních postupů lze využít kardiální či respirační gating k dosažení 3D zobrazení pohyblivých struktur v čase. Řada studií prokázala, že opakované mikro-CT skenování neovlivňuje negativně biologické děje v organismu, které jsou standardně hodnocené.

Závěrem lze konstatovat, že mikro-CT se stává standardní metodou charakterizace tkáňových nosičů za různých podmínek, s širokým spektrem aplikací. Poskytuje mnoho výhod oproti konvenčním postupům, přičemž hlavními výhodami jsou nedestruktivita, časová efektivita, 2D a 3D vizualizace a přímá 3D analýza struktury. Je s výhodou používána jako komplementární metoda ke konvenčním postupům (histologie). Nahrazení konvenční histologie je možné pouze pro některé histomorfometrické parametry kostní tkáně.

4.3 Biodegradabilní osteosyntetický materiál v *in-vivo* experimentu

4.3.1 Vizualizace a analýza rozpadu hořčíkových slitin

Komentář k publikaci: **In vivo study on biodegradable magnesium alloys: Bone healing around WE43 screws.**

Levorová J., Dušková J., Drahoš M., Vrbová R., Vojtěch D., Kubásek J., Bartoš M., Dugová L., Ulmann D., Foltán R.

Journal of Biomaterials Applications (2018) 32(7):886-895

doi: 10.1177/0885328217743321

IF = 2,082

Řešení kostních zlomenin pomocí osteosyntézy je běžnou metodou ošetření. Standardní osteosyntetický materiál představuje titan a jeho slitiny. Mezi hlavní výhody patří dostatečná mechanická odolnost, biokompatibilita a dnes již bohaté klinické zkušenosti. Mezi nevýhody patří odlišné mechanické vlastnosti ve srovnání s kostní tkání, které mohou vést k nežádoucímu přenosu zatížení (tzv. stress shielding) a k lokalizované osteopenii. Nevýhodou je dále negativní vliv na rostoucí skelet, vznik artefaktů při zobrazovacích metodách a potřeba sekundární operace v případě nutnosti vyjmutí materiálu, což zatěžuje pacienta i zdravotní systém. Ve snaze o eliminaci uvedených nevýhod jsou vyvíjeny resorbovatelné materiály. Jedná se buď o polymery (PLA, PGA, PLGA aj.) nebo kovy (Mg). Polymery byly široce zkoumány a testovány a jsou již užívány v klinické praxi (zejména v případě rostoucího skeletu). Průběh degradace a biokompatibilita je uspokojivá, problémem jsou horší mechanické vlastnosti, vedoucí k nutnosti použití většího objemu materiálu a vyšší cena. Jako alternativa jsou zkoumány resorbovatelné kovy, nejvíce hořčík a jeho slitiny. Ty zajišťují výhodnější mechanické vlastnosti a lepší RTG denzitu při hodnocení zobrazovacími metodami (vyšší oproti polymerům, nižší než titan). Problém představuje nastavení procesu degradace, který musí časoprostorově odpovídat hojení kostní tkáně, a vznik rozpadových produktů, což představuje riziko lokalizovaného hromadění H₂ a akumulace iontů kovů obsažených ve slitině v organismu.

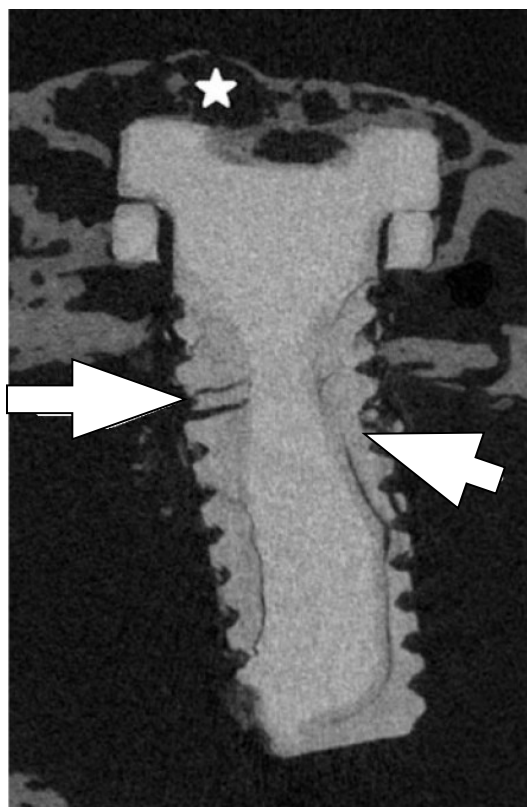
Hlavní cíle práce:

- analyzovat průběh degradace implantátů a reakci okolní kostní tkáně.

V uvedeném *in-vivo* projektu byla testována slitina na bázi hořčíku (WE43: Mg-4Y-3Nd-Zr), ze které byly připraveny implantáty (tvar šroubu), jež byly zavedeny do králíčích tibií. Jako kontrolní materiál byly použity implantáty z čistého titanu. Vzorky kostní tkáně s implantáty byly po usmrcení

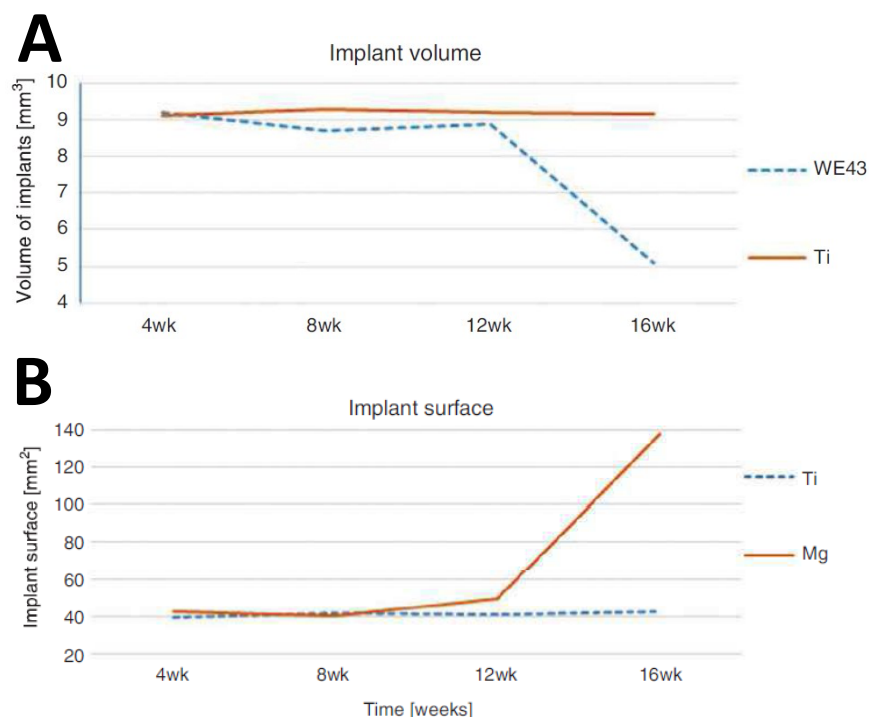
experimentálních zvířat ve stanovených časových intervalech (4, 8, 12, 16 týdnů) a po jejich zpracování hodnoceny pomocí histologie a mikro-CT.

Vzorky byly po vyjmutí z organismu zafixovány a zality do metylmetakrylátu. Takto připravený bloček byl mikro-CT naskenován, zpracován na řezy a odeslán k histologickému hodnocení. Mikro-CT data byla využita k vizualizacím a analýzám. Zobrazení titanu i slitiny WE43 bylo velmi dobré. RTG denzita Mg slitiny byla nižší. Ani jeden materiál nevedl ke vzniku významných artefaktů (metal induced artifacts). Pomocí 2D i 3D zobrazení byly pozorovány změny u WE43, kdy docházelo ke vzniku fraktur, resorpci a změně tvaru. Novotvořená kostní tkáň se napojovala na povrch implantátu, avšak u některých vzorků tento kontakt chyběl v oblasti preparované štoly. Degradace se významně zvýšila mezi intervaly 12 a 16 týdnů (obr. 22). Kompletní degradace však pozorována nebyla. Titanové implantáty již po čtyřech týdnech jevíly známky úspěšné osseointegrace a nevykazovaly komplikace. U některých vzorků byla patrná periostální reakce, a to nejvíce u WE43 slitiny (obr. 22 - *).



Obr. 22: Mikro-CT 2D snímek degradace WE43 implantátu po 16 týdnech hojení. Šipky znázorňují oblasti fragmentace. Je patrná periostální reakce a přerůstání implantátu kostní tkání (). Ilustrace z uvedené publikace.*

Mikro-CT 3D analýza hodnotila objem a povrch implantátů. Objemové změny u WE43 byly pozorovány až mezi posledními dvěma časovými intervaly, kdy došlo k redukci objemu o téměř 50 %. Titanové implantáty zůstaly beze změny. Povrch mírně narůstá u WE43 mezi 8 a 12 týdnem, avšak významný nárůst je pozorován až mezi 12 a 16 týdnem. V průběhu degradace tedy dochází ke snižování objemu a přechodnému nárůstu povrchu, který je dán fragmentací materiálu a tvorbou nových ploch (obr. 23). Tyto se zároveň stávají aktivními povrchy, které jsou dostupné pro degradační děje. Hodnota BIC u WE43 byla nejvyšší po 8 týdnech.



Obr. 23: Mikro-CT 3D analýza objemu (A) a povrchu (B) implantátů. Ilustrace z uvedené publikace.

Doba degradace materiálu je postačující v případě nekomplikovaného kostního hojení. Pokud by však byla nezbytná delší doba fixace, výrazná akcelerace degradace po dvanácti týdnech od implantace je riziková. Biologická reakce okolní tkáně byla histologicky hodnocena jako uspokojivá a rozdíly mezi titanem a WE43 nebyly významné. Mikro-CT bylo užito jako výhodná nedestruktivní metoda umožňující vizualizace a kvantifikace strukturních parametrů kovových implantátů. U žádného experimentálního zvířete nebyly v průběhu pokusu pozorovány komplikace.

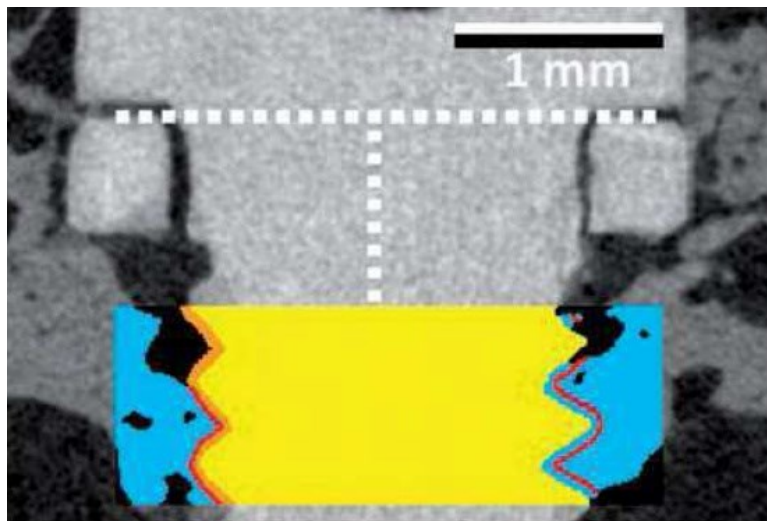
Práce byla zaměřena pouze na degradaci materiálu a reakci okolní tkáně. V další fázi by bylo vhodné materiál testovat v podmínkách simulující reálnou klinickou situaci, tedy ošetření kostní zlomeniny. Ve studii bylo implantováno poměrně malé množství slitiny WE43, takže by bylo nezbytné zjistit, zda větší množství (například osteosyntetická dlaha a větší množství fixačních šroubů) již nevyvolá nežádoucí reakci v důsledku většího množství degradačních produktů.

Využití mikro-CT v rámci projektu:

- vizualizace (2D, 3D) implantátu a kostní tkáně ve stanovených časových intervalech;
- analýza strukturních parametrů (objem a implantátu) ve stanovených časových intervalech;
- vyhodnocení BIC (bone implant contact; kontakt kostní tkáně s povrchem implantátu).

RTG denzita Mg slitin je nižší než u titanu. Titan je pro mikro-CT skenování přijatelný materiál, avšak jeho denzita může vést k přítomnosti kovových artefaktů (metal-induced artifacts) v závislosti na složení slitiny. Ty se projevují nejvíce v těsné blízkosti povrchu implantátu a činí tuto kritickou oblast obtížně

hodnotitelnou. Z těchto důvodů je při mikro-CT analýze nutné hodnotit kontakt s okolní kostní tkání (BIC) či její strukturu v okolí v určité vzdálenosti od povrchu implantátu (obr. 24). Jako doporučená hodnota je uvedena vzdálenost 5-7 pixelů (závisí tedy na rozlišení, hodnota není absolutně dána; Song J.W. et al., 2013). V případě Mg slitin je přítomnost takových artefaktů redukována, avšak udržení podobného odstupu snižuje riziko falešně zvýšených hodnot BIC. V řadě studií byla potvrzena vysoká míra korelace mezi mikro-CT BIC a histologicky stanovenou hodnotu BIC (He T. et al., 2017; Gabler C. et al., 2015; Song J.W. et al., 2013).



Obr. 24: Příklad hodnocení BIC pomocí mikro-CT. V definované oblasti je vymezen implantát (žlutě), kostní tkáň (modře), měkké tkáně (černá), expanze implantátu o definovanou hodnotu počtu pixelů (oranžová). BIC je stanoven jako kontakt mezi okrajem expandované oblasti a kostní tkání (červená) a je vztažen k povrchu expandované oblasti. Ilustrace z uvedené publikace.

Kraus a kol. ve své *in-vivo* studii užívá dva typy Mg slitin s rozdílnou mírou degradace. Hodnotí průběh jejich degradace (residuální objem, povrch implantátů a tvorbu plynu) a reakci okolních tkání u potkana. Jedná se o *in-vivo* mikro-CT studii, probíhající po dobu dvaceti čtyř týdnů (ve srovnání s ostatními studiemi jde o poměrně dlouhý časový interval), každé čtyři týdny je proveden sken. Závěrem je zhotoveno histologické hodnocení. Slitina s rychlejší degradací vede k výrazné tvorbě vodíku, jež se kumuluje v měkkých tkáních. Překvapivě však hojení proběhlo bez klinicky patrných komplikací a v obou případech došlo k uspokojivému kostnímu hojení, což předjímá možnou klinickou aplikaci (Kraus T. et al., 2012).

Tým Amerstorfera a kol. se zabýval dlouhodobým vlivem na tkáně v okolí implantátu a navazoval na studii T. Kraus z roku 2012. Vyšetřovací modalita představuje *in-vivo* mikro-CT skenování, histologie a LA-ICP-MS (Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry). Typy slitiny (s pomalou (WZ21) a rychlou (ZX50) degradací) byly studovány u potkanů. Klinický průběh obou skupin byl bez komplikací. Kostní hojení po resorpci implantátu bylo uspokojivé v obou skupinách. Histologické vyšetření neshledalo známky zánětlivé reakce v okolí cizího tělesa. Rychle degradující slitina vedla k vyšší tvorbě plynu. V okolí implantátu byly v průběhu degradace detekovány částice slitiny, které byly

postupně eliminovány. Obojí uvedené nemělo zjevný negativní vliv na průběh hojení (Amerstorfer F. et al., 2016).

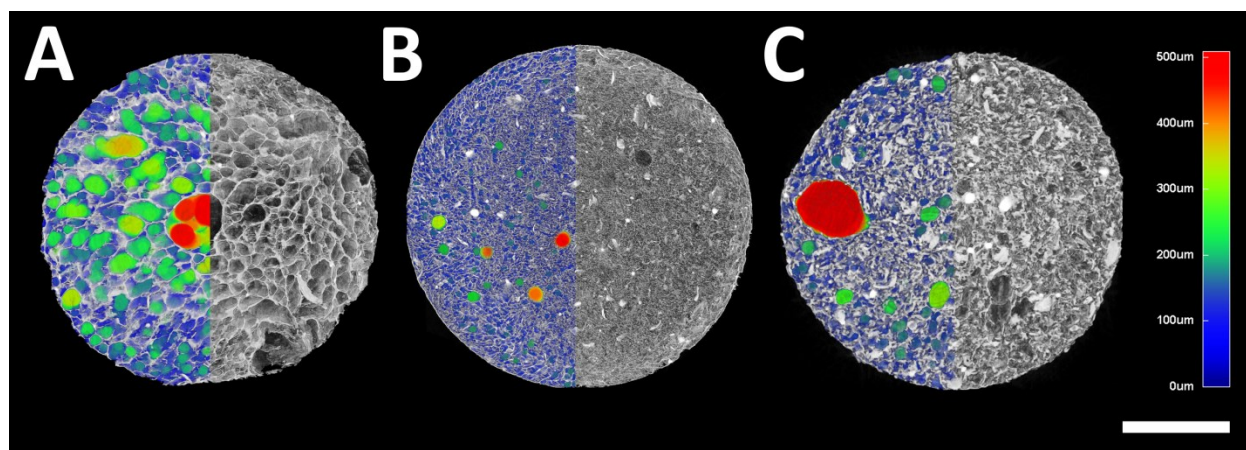
Schaller a kol. studovali Mg slitinu, kterou u poloviny vzorků modifikovali povlakem (MAGOXID), s cílem příznivě ovlivnit průběh degradace a její reakci s okolní tkání. Kontrolní materiál byl titan. Studie probíhala *in-vivo* u miniprasete v oblasti os frontale. Hodnocené parametry představovaly BIC (Bone-implant-contact), residuální objem implantátu, objem okolní kostní tkáně v okolí. K hodnocení bylo použito CT, mikro-CT a histologie (interval 12 a 24 týdnů), RTG bylo použito 1, 4 a 8 týdnů od implantace. Klinický průběh byl u všech implantovaných vzorků klidný. Přítomnost plynu v měkkých tkáních byla pozorována nejvíce po čtyřech týdnech u nepovlakovaného materiálu na RTG. Povlakovaný materiál jevil nižší míru degradace, vyšší objem kostní tkáně v okolí a vyšší BIC (Schaller B. et al., 2016). Publikované studie zaměřené na humánní klinickou aplikaci slitiny hořčíku k ostesyntéze jsou doposud ojedinělé, často jde pouze o prezentaci případu či série případů. Ačkoliv jsou výsledky hodnoceny jako úspěšné (např. Gigante A. et al., 2018; Biber R. et al., 2016; Yu X. et al., 2015), v současné době přetrvává nedostatek důkazů k prokázání účinnosti, efektivity, predikovatelnosti a bezpečnosti.

4.4 Vybrané aspekty mikro-CT

4.4.1 Výhody mikro-CT

Mikro-CT umožňuje nedestruktivně skenovat a hodnotit celý zkoumaný vzorek, a to s rozlišením v řádu mikrometrů. Obecně není nutná speciální příprava vzorku, která jej může poškozovat a ovlivňovat jeho strukturu (např. příprava řezů, pokryv vodivou vrstvou pro SEM). Po naskenování je možné vzorek použít k jiným vyšetřovacím metodám (např. histologie, mechanické testy) nebo může být skladován pro možné využití v budoucnu, což je zásadní u vzácných muzeálních exponátů (Landis E. N. a Keane D. T., 2010). V případě aplikace RTG kontrastování je vzorek běžnými histologickými postupy vyšetřitelný a v některých pracích je popisována i možnost imunohistochemického hodnocení (např. Dullin C. et al., 2017). Mikro-CT je časově velice efektivní. Ve srovnání např. s histologií zde odpadá pracná příprava vzorku (v oblasti kostní biologie též dekalifikace tkáně), případně manuální či semiautomatická rekonstrukce jednotlivých řezů pro 3D zobrazení. Po provedení úspěšných pilotních pokusů zpracování dat je možné některé procesy automatizovat. V případě hodnocení sady podobných vzorků (vyžadující stejné parametry obrazové akvizice) lze automatizovat i proces skenování využitím speciálního přístroje, který umožňuje výměnu vzorků mezi zásobníkem a micro-stage.

Hlavním výstupem mikro-CT je vizualizace daného vzorku. 2D průřezové snímky je možné v každé ze základních na sebe kolmých rovin (coronal, sagital, transversal) posouvat o „tloušťku řezu“, která odpovídá velikosti jednoho pixelu a je tedy standardně menší než tloušťka histologického preparátu. Orientace roviny řezu však může být libovolná a v případě zvolení roviny, která není se základními paralelní, je její zobrazení automaticky vypočítáno. V rámci 3D vizualizací je možné vzorek prohlížet z libovolného pohledu, po přiblížení či oddálení i po nastavení vlastností objektu (např. barva, osvětlení povrchu, stínování, odraz světla; viz obr. 25). Určité části vzorku lze barevně odlišit (např. barevně po segmentování vybrané struktury; viz obr. 5.) a zhotovit kombinaci s průřezy vzorkem, což významně zvyšuje informační hodnotu snímku. Zobrazení struktury může být kombinováno i s výsledky analýzy. Typickým příkladem je vizualizace hodnoty velikosti pórů v porézních biomateriálech, kdy barva daného póru koreluje s jeho velikostí na základě vytvoření tzv. pseudobarevné škály (viz obr. 25). Velice názorná jsou též 3D videa, která jsou pro prezentaci trojrozměrné struktury velice efektivní. Pro zlepšení prostorové představy je možné využít i principy stereoskopie, kdy lze připravit vizualizace s barevnou i prostorovou odlišnou úpravou pro pravé a levé oko, která vede k vytvoření 3D efektu zobrazení (pomocí 3D brýlí).



Obr. 25: Vizualizace 3 typů (A, B, C) porézních kompozitních tkáňových nosičů (vlastní data; převzato z Bartoš M. et al., 2018). Na snímcích je 3D vizualizace vzorku kombinovaná s průřezem kolmo na podélnou osu. Pravé části nosiče jsou ve stupních šedi a na nich je dobře patrná struktura nosiče, velikost a tvar pórů. V levé části je kombinováno zobrazení matrice nosiče (stupně šedi) s porozitou, která je barevně kódována dle velikosti póru (počítáno sphere-fitting algoritmem). Protože se jedná o průřez, může být zobrazení zdánlivě matoucí, např. pokud je v řezu zachycen velký pór pouze okrajově (pak bude barva odpovídat vyšší hodnotě než barva v daném řezu větších sousedních pórů – patrné na snímku B). Měřítko = 3 mm; vpravo barevně kódované měřítko.

Mikro-CT zobrazení vzorku též umožňuje cílený výběr jeho vhodné části a orientaci řezu při přípravě histologických preparátů a v některých specializovaných laboratořích se toto stává standardem. Od mikro-CT nelze požadovat výstupy srovnatelné s histologickou analýzou, ačkoliv některé parametry jsou takto hodnotitelné a hovoří se o tzv. „virtual 3D histology“ (Albers J. et al, 2018). V některých studiích byla využita metoda „virtuálního barvení“, při kterých byla převedena RTG denzita na barvení dle hematoxylin-eosinu (Khimchenko A. et al, 2016).

Zásadní předností mikro-CT jsou rozsáhlé možnosti kvantifikace získaných dat (2D a 3D analýza). Existuje široké spektrum 2D i 3D parametrů, které mohou být vyhodnoceny (viz 2.1.4 - Tab.2). V případě 3D analýzy tato probíhá na základě hodnocení virtuálního 3D modelu dané struktury a je tedy nezávislá na prostorové orientaci (což je problém u hodnocení na základě 2D dat). Pomocí softwaru užívaného k analýze je možné s daty i rozsáhle pracovat a provádět image processing (viz 3.5). Morfometrická analýza je časově velice efektivní a sama o sobě není subjektivně ovlivněna hodnotitelem (Schladitz K., 2011).

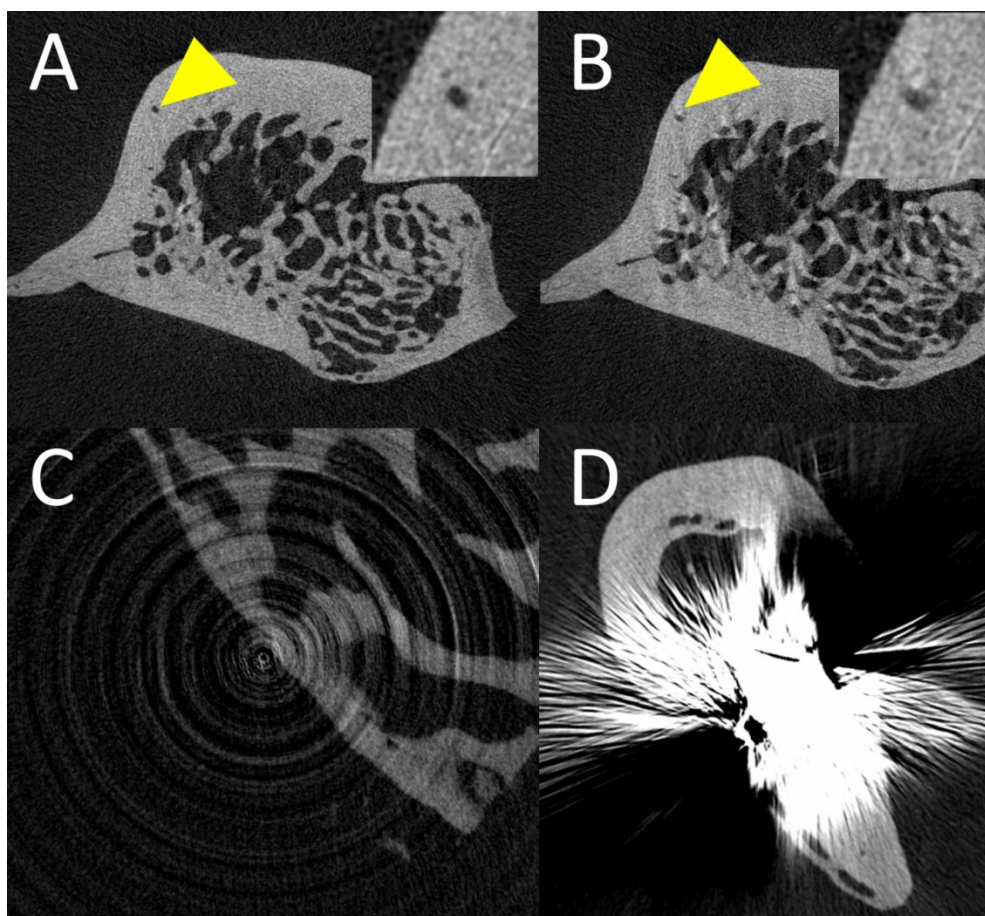
4.4.2 Nevýhody a limitace mikro-CT

K mikrotomografii je nutné přistupovat kriticky, a to s vědomím nedostatků, nevýhod a limitací (Stock S. R., 2008; Boas F.E. a Fleischmann D, 2012; Landis E.N. a Keane D.T., 2010), které snadno mohou vést k zavádějícím výsledkům. Protože výstupem analýz je pouze soubor s hodnotami stanovených parametrů, odhalení těchto omylů může být obtížné a vyžaduje trvalý kritický náhled. Validace a kontrola mnoha analyzovaných parametrů není reálná.

Mikro-CT je s ohledem na velice široké spektrum aplikací multidisciplinární oblastí. Spojovacím prvkem většiny výzkumných mikro-CT pracovníků je tedy metoda samotná. Typický uživatel je vědec, který ve své oblasti výzkumu metodu používá, případně pracovník mikro-CT laboratoře, který se věnuje jak interním, tak externím projektům. Pro ideální aplikaci by bylo vhodné, aby uživatel detailně rozuměl technickým parametrům přístroje (resp. hardware), informačním technologiím a biomatematice (software, hlubší znalost obrazových úprav a procesů analýzy a výpočtů), znal zkoumanou problematiku i ostatní oblasti mikro-CT aplikace. Je zjevné, že tento předpoklad není reálný, což je významná skutečnost. Jednotlivé oblasti aplikace jsou od sebe též často odděleny formou prezentace (články a konference „life“ nebo „material sciences“), ačkoli by mohly sdílet řadu výsledků či metodických postupů. V tomto ohledu jsou unikátní setkání uživatelů mikro-CT, které pořádají někteří výrobci (např. Bruker, Scanco), čímž umožňují uživatelům získat širší náhled a znalost kontextu. Mapování celkové mikro-CT aplikace je tedy obtížné i z tohoto pohledu. Situaci komplikuje už samotné nesjednocení názvu metody, kdy jsou používány promiskue, komplikující vyhledávání studií (micro-CT, microCT, micro CT, mikro-CT,

microtomography, micro-tomography, microcomputed tomography, mCT, uCT, μ CT, μ CT, μ -CT, apod.).

Základním problémem je přítomnost šumu a artefaktů v rekonstruovaných obrazových datech, které mohou vést k chybnému hodnocení dané struktury, komplikovat zobrazení i analýzy. Správně zvolným nastavením parametrů skenu je možné uvedené redukovat, avšak nikoliv eliminovat (viz obr. 26). V principu jsou podobné s artefakty na klinickém CT. Mezi základní artefakty patří kruhové artefakty (ring artifacts), beam hardening, misalignment, pohybové artefakty, artefakty v důsledku přítomnosti RTG hyperdenzní struktury – nejčastěji kovů (metal-induced artifacts) a partial volume effect. Problematika obrazového šumu byla uvedena v bodě 2.1.3.



Obr. 26: Příklady artefaktů na vzorku kostní tkáně (vlastní data): A, B) ukázka nevhodné korekce misalignment parametru: A) dobře kompenzovaný snímek; B) nedostatečná kompenzace; je patrné, že dochází ke změně struktury, změně tvaru, ztráty některých detailů, vzniku oblastí hyper i hypodenzit; v detailu je znázorněna změna tvaru původně oválného póru (žlutá šipka); C) ukázka kruhových artefaktů (ring artifacts); D) vliv kovového materiálu vysoké RTG denzity, který znemožňuje hodnocení dané oblasti.

- **Ring artifacts** vznikají v důsledku nedostatečně provedené flat field kalibrace, která kompenzuje možnou variabilitu v sensitivitě jednotlivých částí detektoru, nebo v důsledku přítomností nečistot na CCD kameře. Toto vede ke stejnému signálu ve stejné pozici v každém rotačním kroku v průběhu skenu. V následné rekonstrukci vzniká horizontální kruhový denzní útvar, jehož středem je centrum rotace. Softwarově je možné částečně tyto artefakty korigovat.
- **Beam hardening** je důsledkem změny spektra RTG záření při průchodu hmotou vedoucí k jeho nerovnoměrné absorpci. Jak již bylo uvedeno, většina záření při mikro-CT skenování je spojitého charakteru. Dochází k postupné absorpci nejprve nízkoenergetického záření v povrchových vrstvách, které působí podobě jako filtr a vzorkem dále postupuje záření s vyšší energií, které má jinou absorpci (proto beam hardening). Výsledkem je zdánlivá nehomogenita struktury vzorku, nejvíce u relativně rozměrných objektů/částí objektů. Povrchové části jsou hyperdenzní ve srovnání s vnitřní částí struktury (cupping artifact). Redukce tohoto artefaktu je možná pomocí užití vhodných filtrů, které záření o nižší energii nepustí. Softwarová korekce umožňuje tento vliv redukovat.
- **Metal-induced artifacts** jsou způsobeny přítomností vysoce RTG denzního materiálu, typicky kovu (např. kovový implantát). Dochází ke vzniku hyperdenzního lemu kolem materiálu, který může paprskitě vyzařovat do okolí (společně s paprsky hypodenzit). Dalším projevem je streaking artifact, který se objevuje mezi dvěma RTG denzními strukturami jako hypodenzní oblast. Softwarová korekce artefaktu je možná jak na primárních datech (projekční snímky), tak na rekonstrukcích, avšak je limitovaná.
- **Misalignment artifacts** jsou projevem drobného pohybu, který může v průběhu skenování vzniknout rotací držáku vzorku na micro-stage přístroji. Projevem je změna struktury vzorku, která však při nedostatku zkušeností uživatele s mikro-CT a hodnocením daného typu vzorku, může být přehlédnuta a považována za skutečný obraz struktury.
- **Pohybové artefakty** jsou nejčastěji způsobeny pohybem vzorku na nosiči v důsledku nedostatečné mechanické stabilizace, změn ve struktuře vzorku, nevhodné fixace, hydratace či naopak vysychání vzorku. Data jsou obvykle nepoužitelná.
- **Partial volume effect** je založen na průměrování hodnoty atenuace v jednotlivých senzorech - budoucích pixelech. Příčinou je diskrétní (nespojité) snímání prošlého záření pomocí jednotlivých jednotek senzoru, které jsou izolované, a následně rekonstrukce do omezeného množství pixelů. Pokud poměrně malý objekt zaujímá jen několik pixelů, pak lze předpokládat, že hranice objekt-pozadí bude probíhat uvnitř senzoru, a tedy že detekované záření bude v daném senzoru průměrováno na nižší hodnoty. Stejně tak v rámci rekonstrukce bude mít tento pixel nižší denzitu. U

relativně malých objektů bude vyšší podíl partial pixelů vyšší než u větších, zároveň však záleží na hodnotě pixel size. Tento artefakt působí zdánlivou heterogenitu struktury materiálově homogenního vzorku a nejvíce se projevuje na strukturách relativně malých rozměrů, například stěny porézního biomateriálu. Výsledkem je relativně nižší denzita tenkých částí vzorku oproti silnějším, ačkoli lze předpokládat, že materiálová struktura je identická a RTG denzity by proto měly být shodné. V důsledku je komplikovaná např. binarizace, kdy méně denzní části objektu budou běžnými postupy hodnoceny jako pozadí, a tedy jako objekt ztraceny. Pokud bude binarizace „shovívavější“ k těmto částem, může významným způsobem narůst obrazový šum, který bude mít podobnou denzitu.

Provedení analýzy mikro-CT dat vede k získání hodnot strukturních parametrů, které jsou přesně vypočítány. Je však nezbytné zachovat dostatečný kritický náhled, protože nemusí být jisté, zda analyzovaný virtuální objekt odpovídá reálné situaci (příp. jeho záměrné modifikaci).

Jako základní příklady lze uvést:

Nevhodně nastavená binarizace

- zvětšení objektů, zvýšení přítomnosti šumových pixelů (resp. voxelů, které mohou zvyšovat počet objektů), vznik falešných komunikací mezi objekty (redukce počtu objektů);
- zmenšení objemu objektů, umělá fragmentace objektů (navýšení počtu objektů).

Nedostatečná redukce šumu

- přítomnost šumových pixelů (resp. voxelů), změna tvaru objektu, vznik falešných spojení mezi objekty, nárůst povrchu, falešná redukce velikosti pórů (přítomnost šumových pixelů uvnitř póru)

Nevhodný výběr ROI/VOI

- nevědomky vypočítané hodnoty jiné struktury, než které jsou žádoucí, případně hodnoty vztažené k nesprávné referenční hodnotě.

Ačkoliv je s ohledem na mnohé výhody mikro-CT dostupné rozlišení vynikající, stále představuje významnou limitaci. Důsledky jsou patrné hlavně při hodnocení struktur na hranici rozlišení (např. porézní tkáňové nosiče), kdy část struktury, která je reálně přítomna a verifikována např. pomocí SEM, není mikro-CT zachycena.

Produkovaná obrazová data mají výraznou datovou náročnost. S ohledem na rozlišení pořizovaných snímků a zvolený rozsah rotace (180° či 360°) celý dataset projekcí zabírá v rozmezí 0,5GB – 100 GB. Rekonstruované datasey zabírají dále jednotky až desítky GB. V případě studie většího počtu vzorků skenovaných na vysoké rozlišení vznikají soubory v řádech TB. Operační paměť PC, který je k mikro-CT

využíván, musí být schopna tyto náročné operace provést. Zhotovení kompletních 3D analýz sady vzorků může znamenat časovou náročnost v řádu desítek hodin.

4.4.3 Mikro-CT tkáňových nosičů: standardní metoda bez standardizace

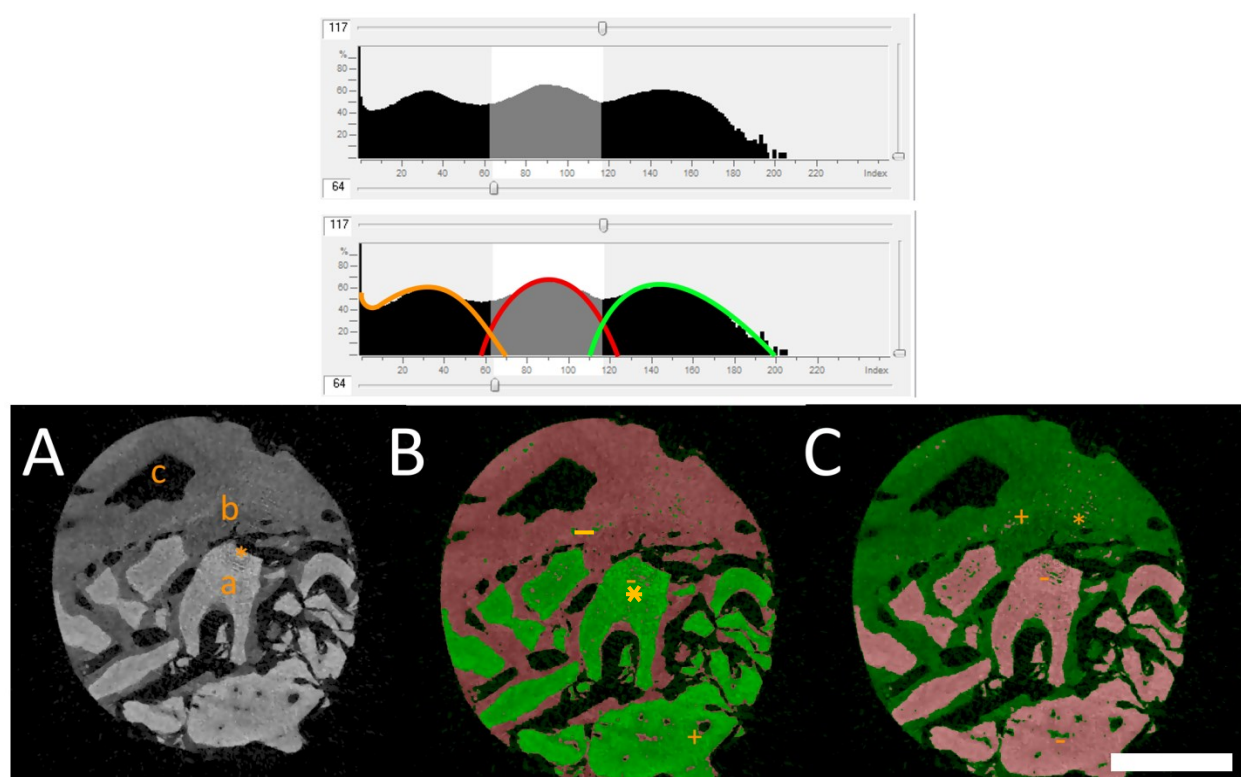
Mikro-CT zobrazovací metoda je v kostním tkáňovém inženýrství extenzivně využívána v posledních dvou dekádách. Dle analýz databáze PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) docházelo v letech 2000-2009 k pozvolnému nárůstu článků v této oblasti (vyhledávání micro-CT AND scaffold), k výraznému nárůstu došlo v letech 2010-2015, od té doby je vývoj přibližně stabilní, s počtem cca 140 nových článků ročně. Celkový počet publikací je přibližně 1170 (ke dni 30. 11. 2019). Ačkoliv se jedná o již standardní metodu k hodnocení 3D struktury tkáňových nosičů, metodologická nejednoznačnost a nedostatečná forma prezentace postupu a výsledků mikro-CT analýz je přetrvávajícím problémem. Z důvodu narůstajícího rozšíření této metody a uživatelské vstřícnosti moderních mikro-CT přístrojů lze předpokládat, že tato roztržitost bude pokračovat. Některé práce se pokouší standardizaci zavádět, avšak jejich vliv je omezený (např. již zmíněná práce Bouxsein M.L. et al., 2010; du Plessis A. et al., 2017). Komplexní zhodnocení této oblasti aplikace se tak stává velice problematické.

Tuto problematiku výstižně shrnuje v současné práci Ibrahim Cengiz, který společně s R. L. Reitem provedl analýzu publikací z roku 2016 (vybráno jako reprezentativní časový úsek) zaměřených na mikro-CT a hodnocení 3D struktury tkáňových nosičů. (Cengiz I. et al., 2018). Ve studovaných pracích je velice často nalézán nedostatečný popis průběhu mikro-CT skenování, tedy umístění vzorku, fixace, akviziciční parametry (velikost pixelu, rotační krok, stupně rotace, průměrování snímku, nastavení filtru atp.). Obdobné problémy uvádí při následné práci s daty (chybějící informace o rekonstrukci obrazu, vizualizaci, image processingu a zejména analýzách). Terminologické nejasnosti jsou také častým problémem, a to i na základní úrovni záměny termínů velikosti pixelu/voxelu a rozlišení. Prezentace výsledků taktéž není sjednocená. V případě hodnocení a porovnávání výsledků jednotlivých studií mezi sebou je nezbytné uvedené uvažovat, protože ačkoliv mohou působit dojmem komparabilních výsledků stejné metody, nemusí tomu tak být.

4.4.4 Tkáňové nosiče a segmentace obrazu

V průběhu hodnocení se jako důležitý ukazuje problém se segmentací (rozdělením) jednotlivých složek obrazu (např. scaffold proti pozadí, kost proti scaffoldu), která je pro zhotovení přesné analýzy nezbytná (viz obr. 27). Příčinou je překrývající se spektrum denzity obou materiálů, jež je typicky přítomné. V případě modelové situace se dvěma objekty (kost a scaffold) vznikají tři fáze denzity: pouze kost, pouze scaffold, překryv kosti a scaffoldu. Poslední uvedená fáze je velice citlivá na segmentační (resp. binarizační procesy) a tedy náchylná k chybě. Drobná změna v binarizaci významně zvýší objem

scaffoldu se všemi odvozenými parametry a naopak. V závislosti na typu materiálů je tento překryv různě významný. Situaci navíc komplikuje přítomnost obrazových artefaktů, které jsou diskutovány v části 4.1.4. Problematikou se zabývají například práce Jones A.C., 2007; Brun F. et al., 2011; Polak J.S., 2012; Sweedy A. et al., 2017, které vytváří a testují různé výpočetní algoritmy pro zpracování obrazu. Tento problém popisuje Iida v současné práci zaměřené na mikro-CT a histologické hodnocení kostní novotvorby v oblasti augmentátu u sinus lift procedury v rámci orální chirurgie (Iida T. et al., 2018).



Obr.27 : Ilustrace problematiky segmentace obrazu na příkladu augmentačního materiálu v kostní tkáni (vlastní data). Byla provedena pouze binarizace nativního obrazu bez jakýchkoliv úprav. Objekt (tj. bílá) je pro názornost uveden červeně. V horní části je histogram hodnot stupňů šedi, kde jsou patrné tři překrývající se složky (měkké tkáně, kost, augmentát), které jsou pro ilustraci barevně odděleny ve spodním histogramu. Právě překrývající se oblasti působí hlavní komplikace při binarizaci. A) Průřezový snímek ve stupních šedi; je patrný augmentační materiál (a), kostní tkáň (b), měkké tkáně (c); v centrální části drobné kruhové artefakty (*), jejichž vliv se promítá i do segmentace; B) zvolení binarizace pouze kostní tkáně; je patrné, že část kosti s vyšší densitou je vyloučena (-) a naopak jsou jako kostní tkáň vyhodnoceny okraje augmentačního materiálu (+), což může zkreslit výsledky analýz; C) zvolení binarizace pouze augmentačního materiálu, kdy jsou patrné některé defekty v jeho struktuře (-); naopak densní části kosti jsou vyhodnoceny jako augmentační materiál (+), zejména v místě kruhových artefaktů (*). Měřítka = 1 mm.

5. Závěry

- V rámci doktorského studia byla hodnocena řada aspektů aplikace mikrotomografie ve výzkumu biomateriálů (kovových i nekovových) vyvíjených pro účely kostní regenerace, a to včetně možnosti validace výsledků a komparace se standardními metodami hodnocení. Mikro-CT představuje významnou 3D zobrazovací metodu, která zároveň umožňuje kvantifikaci struktury zkoumaných vzorků. Na základě provedených studií byl potvrzen významný přínos zobrazovací metody mikro-CT s předpokladem jejího dalšího rozšíření a standardizace v řadě výzkumných oblastí.
- Porovnání různých postupů hodnocení velikosti pórů tkáňových nosičů pomocí mikro-CT a skenovací elektronové mikroskopie (SEM) bylo reakcí na dosavadní absenci konsensu hodnocení tohoto parametru, a to navíc za situace, kdy jsou zcela běžně v publikacích studovány a doporučovány konkrétní hodnoty. Uvedli jsme problematičnost tohoto úkolu a značné rozdíly v dosažených hodnotách (hodnocení pomocí SEM dosahovalo přibližně trojnásobných hodnot oproti mikro-CT), což umožňuje komparaci studií využívajících pouze jednu z metod. Mikro-CT se nám z řady důvodů jeví jako výhodnější (přímá 3D analýza, nedestruktivita, časová efektivita aj.).
- Při řešení otázky validace mikro-CT výsledků byl vyvinut software, který umožňuje generování fantomových datasetů 3D objektů o známých prostorových parametrech pro testování mikro-CT analýzy a vlivu modifikace obrazových dat. Pozorované rozdíly mezi zadanými parametry 3D objektů a výsledky mikro-CT analýzy dosahovaly přibližně 5% u objemových a 15% u povrchových parametrů. Chyba výrazně narůstala při nižším rozlišení (nejvíce poté, co velikost voxelu přesáhla 1/10 průměru typického objektu v datasetu) a vyšší intenzitě obrazového šumu.
- Ve srovnávací studii hodnocení objemu a tloušťky kortikální a trabekulární kostní tkáně nebyly shledány statisticky signifikantní rozdíly mezi mikro-CT 3D analýzou a histologickými metodami (výbrusy a dekalcifikované parafinové řezy). Mikro-CT v tomto případě může zastoupit konvenční postup s výhodou nedestruktivity, časové efektivity a vyhodnocení celého vzorku.
- Mikro-CT bylo úspěšně použito při hodnocení struktury tkáňových nosičů pro kostní regeneraci a tím umožnilo mj. optimalizovat proces přípravy a podpořit výběr vzorků k dalšímu testování. Zásadní pro hodnocení byly parametry porozity. Mikro-CT umožňuje její 3D hodnocení a přesné odlišení otevřených a uzavřených pórů. Zaměřili jsme se též na změny struktury tkáňových nosičů v důsledku hydratace, což odpovídá reálné situaci nastávající po implantaci materiálu. Z výsledků vyplývá, že dochází k významným změnám mechanických vlastností při nevýznamných změnách struktury studovaných vzorků. V samostatném projektu byla charakterizována struktura polylaktidových 3D tištěných tkáňových nosičů, která byla porovnána se zadanými parametry.

- Mikro-CT jsme využili k hodnocení in-vivo experimentu resorbovatelného osteosyntetického materiálu (hořčíková slitina WE43), při kterém byly stanoveny objemové a povrchové změny implantátů. Degradace materiálu akcelerovala po 12 týdnech. Objem se postupně snižoval, detekovali jsme fragmentace implantátu a s tím související přechodný nárůst povrchu. Po 16 týdnech bylo přibližně 50% objemu implantátu degradováno a fragmentováno do menších částí.

6. Publikované práce autora (IF) ve vztahu k dizertaci - seznam

- 1) Bartoš M., Suchý T., Foltán R.: Note on the use of different approaches to determine the pore sizes of tissue engineering scaffolds: what do we measure? BioMedical Engineering OnLine. 2018 Aug; 17(1):110. doi: 10.1186/s12938-018-0543-z

IF= 1.676

- 2) Jiřík M., Bartoš M., Tomášek P., Malečková A., Kural T., Horáková J., Lukáš D., Suchý T., Kochová P., Hubálek Kalbáčová M., Králíčková M., Tonar Z.: Generating standardized image data for testing and calibrating quantification of volumes, surfaces, lengths and object counts in fibrous and porous materials using Xray microtomography. Microscopy Research and Technique. 2018 Jun; 81(6):551-568. doi: 10.1002/jemt.23011. First two authors contributed equally to the manuscript

IF = 1.327

- 3) Kubíková T., Bartoš M., Juhás Š., Suchý T., Sauerová P., Hubálek Kalbáčová M., Tonar Z.: Comparison of ground sections, paraffin sections and micro-CT imaging of bone from the epiphysis of the porcine femur for quantitative histological evaluation . Annals of Anatomy. 2018 Nov; 220:85-96. doi: 10.1016/j.aanat.2018.07.004

IF= 1,852

- 4) Gregor A., Filová E., Novák M., Kronek J., Chlup H., Buzgo M., Blahnová V., Lukášová V., Bartoš M., Nečas A., Hošek J.: Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. Journal of Biological Engineering. 2017 Oct;11:31. doi: 10.1186/s13036-017-0074-3

IF=5.256

- 5) Suchý T., Šupová M, Bartoš M., Sedláček R., Piola M., Soncini M., Fiore G.B., Sauerová P., Hubálek Kalbáčová M.: Dry versus hydrated collagen scaffolds: are dry states representative of hydrated states? *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2018 Feb; 29(3):20.doi: 10.1007/s10856-017-6024-2

IF = 2,448

- 6) Bartoš M., Suchý T., Tonar Z., Foltán R., Hubálek Kalbáčová M.: Micro-CT in tissue engineering scaffolds designed for bone regeneration: principles and application. *Ceramics-silikáty*. 2018; 62(2),194 - 199. doi: 10.13168/cs.2018.0012

IF= 0,680

- 7) Sauerová P., Suchý T., Šupová M., Bartoš M., Klíma J., Juhásová J., Juhás Š., Kubíková T., Tonar Z., Sedláček R., Piola M., Fiore G.B., Soncini M., Hubálek Kalbáčová M.: Positive impact of dynamic seeding of mesenchymal stem cells on bone-like biodegradable scaffolds with increased content of calcium phosphate nanoparticles. *Mol Biol Rep*. 2019 Jun 10. doi: 10.1007/s11033-019-04903-7. [Epub ahead of print]

IF= 1.889

- 8) Levorová J., Dušková J., Drahoš M., Vrbová R., Vojtěch D., Kubásek J., Bartoš M., Dugová L., Ulmann D., Foltán R.: In vivo study on biodegradable magnesium alloys: Bone healing around WE43 screws. *Journal of Biomaterials Applications*. 2018 Feb; 32(7):886-895. doi: 10.1177/0885328217743321

IF = 2,082

7. Literatura

- Abagnale G., Steger M., Nguyen V.H., Hersch N., Sechi A., Jousen S., Denecke B., Merkel R., Hoffmann B., Dreser A., Schnakenberg U., Gillner A., Wagner W.: Surface topography enhances differentiation of mesenchymal stem cells towards osteogenic and adipogenic lineages. *Biomaterials*. Volume 61, August 2015, Pages 316-326. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.030>
- Agnihotry A., Fedorowicz Z., Nasser M., Gill K.S.: Resorbable versus titanium plates for orthognathic surgery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Oct 4;10:CD006204. doi: 10.1002/14651858.CD006204.pub3.
- Albanese A., Licata M.E., Polizzi B., Campisi G.: Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immun Ageing*. 2013; 10: 23. Published online 2013 Jun 13. doi: 10.1186/1742-4933-10-23
- Alberich-Bayarri A., Moratal D., Ivirico J.L., Rodríguez Hernández J.C., Vallés-Lluch A., Martí-Bonmatí L., Estellés J.M., Mano J.F., Pradas M.M., Ribelles J.L., Salmerón-Sánchez M.: Microcomputed tomography and microfinite element modeling for evaluating polymer scaffolds architecture and their mechanical properties. *Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Oct;91(1):191-202. doi: 10.1002/jbm.b.31389
- Albers J., Pacilé S., Markus M.A., Wiart M., Vande Velde G., Tromba G., Dullin C.: X-ray-Based 3D Virtual Histology-Adding the Next Dimension to Histological Analysis. *Mol Imaging Biol*. 2018 Oct;20(5):732-741. doi: 10.1007/s11307-018-1246-3.
- Alves N.M., Pashkuleva I., Reis R.L., Mano J.F.: Controlling cell behavior through the design of polymer surfaces. *Small*. 2010 Oct 18;6(20):2208-20. doi: 10.1002/smll.201000233.
- Amerstorfer F., Fischerauer S.F., Fischer L., Eichler J., Draxler J., Zitek A., Meischel M., Martinelli E., Kraus T., Hann S., Stanzl-Tschegg S.E., Uggowitzer P.J., Löffler J.F., Weinberg A.M., Prohaska T.: Long-term in vivo degradation behavior and near-implant distribution of resorbed elements for magnesium alloys WZ21 and ZX50. *Acta Biomaterialia*. Volume 42, 15 September 2016, Pages 440-450 <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.025>
- Badea C.T., Hedlund L.W., Johnson G.A.: 2004. Micro-CT with respiratory and cardiac gating. *Med. Phys*. 31:3324–29
- Bartoš M., Suchý T., Foltán R.: Note on the use of different approaches to determine the pore sizes of tissue engineering scaffolds: what do we measure? *Biomed Eng Online*. 2018 Aug 17;17(1):110. doi: 10.1186/s12938-018-0543-z.
- Biber R., Pauser J., Geßlein M., Bail H.J.: Case Report: Magnesium-Based Absorbable Metal Screws for Intra-Articular Fracture Fixation. *Case Reports in Orthopedics*. Volume 2016, Article ID 9673174, 4 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9673174>
- Bittner S.M., Smith B.T., Diaz-Gomez L., Hudgins C.D., Melchiorri A.J., Scott D.W., Fisher J.P., Mikos A.G.: Fabrication and mechanical characterization of 3D printed vertical uniform and gradient scaffolds for bone and osteochondral tissue engineering. *Acta Biomater*. 2019 May;90:37-48. doi: 10.1016/j.actbio.2019.03.041
- Boas FE, Fleischmann D. CT artifacts: causes and reduction techniques. *Imaging Med*. 2012. <https://doi.org/10.2217/iim.12.13>.

- Boerckel J.D., Mason D.E., McDermott A.M., Alsberg E.: Microcomputed tomography: approaches and applications in bioengineering. *Stem Cell Res Ther.* 2014 Dec 29;5(6):144. doi: 10.1186/scrt534. Review.
- Bose S., Roy M., Bandyopadhyay A.: Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology.* Volume 30, Issue 10, October 2012, Pages 546-554. Doi: 10.1016/j.tibtech.2012.07.005
- Bose S., Vahabzadeh S., Bandyopadhyay A.: Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today.* Volume 16, Issue 12, December 2013, Pages 496-504.
<https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.11.017>
- Bouxsein M.L., Boyd S.K., Christiansen B.A., Guldberg R.E., Jepsen K.J., Müller R.: Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.
- Bouyer M., Guillot R., Lavaud J., Plettinx C., Olivier C., Curry V., Boutonnat J., Coll J.L., Peyrin F., Jossierand V., Bettiga G., Picart C.: Surface delivery of tunable doses of BMP-2 from an adaptable polymeric scaffold induces volumetric bone regeneration. *Biomaterials.* Volume 104, October 2016, Pages 168-181. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.001>
- Brouwers J.E.M., van Rietbergen, B., Huiskes, R.: No effects of in vivo micro-CT radiation on structural parameters and bone marrow cells in proximal tibia of wistar rats detected after eight weekly scans. *J. Orthop. Res.*, 25: 1325–1332. doi:10.1002/jor.20439
- Bruker micro-CT: Morphometric parameters measured by Skyscan CT-analyser software
- Brun F., Turco G., Accardo A., Paoletti S.: Automated quantitative characterization of alginate/hydroxyapatite bone tissue engineering scaffolds by means of micro-CT image analysis. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* December 2011, Volume 22, Issue 12, pp 2617–2629
- Buie H.R., Campbell G.M., Klinck J.R., MacNeil J.A., Boyd S.K.: Automatic segmentation of cortical and trabecular compartments based on a dual threshold technique for in vivo micro-CT bone analysis. *Bone.* Volume 41, Issue 4, October 2007, Pages 505-515. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.07.007>
- Cao H., Kuboyama N.: A biodegradable porous composite scaffold of PGA/ β -TCP for bone tissue engineering. *Bone.* Volume 46, Issue 2, February 2010, Pages 386-395.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.09.031>
- Caplan A.I.: Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641–650.
- Caplan A.I.: (2017), Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!. *STEM CELLS Translational Medicine*, 6: 1445-1451. doi:10.1002/sctm.17-0051
- Carlson S.K., Classic K.L., Bender C.E., Russell S.J.: 2007. Small animal absorbed radiation dose from serial micro-computed tomography imaging. *Mol. Imaging Biol.* 9:78–82
- Cartmell S., Huynh K., Lin A., Nagaraja S., Guldberg R.: Quantitative microcomputed tomography analysis of mineralization within three-dimensional scaffolds in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2004, 69A(1):97–104
- Cengiz I.F., Oliveira J.M., Reis R.L.: Micro-CT – a digital 3D microstructural voyage into scaffolds: a systematic review of the reported methods and results. *Biomater Res.* 2018; 22: 26. Published online 2018 Sep 26. doi: 10.1186/s40824-018-0136-8
- Cooper D., Turinsky A., Sensen C., Hallgrímsson B.: Effect of Voxel Size on 3D Micro-CT Analysis of Cortical Bone Porosity. *Calcif Tissue Int* (2007) 80: 211. <https://doi.org/10.1007/s00223-005-0274-6>

- Cowan C.M., Aghaloo T., Chou Y.F., Walder B., Zhang X.: Micro-CT evaluation of three dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue Eng.* 2007, 13:501–12
- Dai Q.G., Zhang P., Wu Y.Q., Ma X.H., Pang J., Jiang L.Y., Fang B.: Ovariectomy induces osteoporosis in the maxillary alveolar bone: an in vivo micro-CT and histomorphometric analysis in rats. *Oral Dis.* 2014 Jul;20(5):514-20. doi: 10.1111/odi.12166. Epub 2013 Aug 6.
- Ding M., Hvid I.: Quantification of age-related changes in the structure model type and trabecular thickness of human tibial cancellous bone. *Bone.* 2000 Mar;26(3):291-5.
- du Plessis A., Broeckhoven Ch., Guelpa A., le Roux S.G.: Laboratory x-ray micro-computed tomography: a user guideline for biological samples. *Gigascience.* 2017 Jun; 6(6): 1–11. Published online 2017 Apr 17. doi: 10.1093/gigascience/gix027
- Dullin C., Ufartes R., Larsson E., Martin S., Lazzarini M., Tromba G.: μ CT of ex-vivo stained mouse hearts and embryos enables a precise match between 3D virtual histology, classical histology and immunochemistry. *PLoS ONE.* 2017, 12(2): e0170597. doi:10.1371/journal.pone.0170597
- Elliott J.C., Dover S.D.: X-ray microtomography. *J. Microscopy*, 1982, 126:211-213.
- Esposito M., Felice P., Worthington H.V.: Cochrane Systematic Review - Intervention Version published: 13 May 2014. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008397.pub2>
- Fischerauer S.F., Kraus T., Wu X., Tangl S., Sorantin E., Hänzli A.C., Löffler J.F., Uggowitzer P.J., Weinberg A.M.: In vivo degradation performance of micro-arc-oxidized magnesium implants: a micro-CT study in rats. *Acta Biomater.* 2013 Feb;9(2):5411-20. doi: 10.1016/j.actbio.2012.09.017
- Gabler C., Zietz C., Bieck R., Göhler R., Lindner T., Haenle M., Finke B., Meichsner J., Testrich H., Nowotnick M., Frerich B., Bader R.: Quantification of osseointegration of plasma-polymer coated titanium alloyed implants by means of microcomputed tomography versus histomorphometry. *Biomed Res Int.* 2015;2015:103137. doi: 10.1155/2015/103137
- Gandolfi M.G., Parrilli A.P., Fini M., Prati C., Dummer P.M.: 3D micro-CT analysis of the interface voids associated with Thermafil root fillings used with AH Plus or a flowable MTA sealer. *Int Endod J.* 2013 Mar;46(3):253-63. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02124.x
- Garg T., Singh O., Arora S., Murthy R.: Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2012;29(1):1-63.
- Ghanavati S., Yub L.X., Lerch J.P., Sled J.G.: A perfusion procedure for imaging of the mouse cerebral vasculature by X-ray micro-CT. *Journal of Neuroscience Methods* 221 (2014) 70– 77
- Giannoudis P.V., Einhorn T.A., Marsh D.: Fracture healing: the diamond concept. *Injury.* 2007 Sep; 38 Suppl 4:S3-6.
- Giannoudis, P.V., Kanakaris, N.K., Dimitriou, R., Gill I., Kolimarala V., Montgomery R.J.: The Synergistic Effect of Autograft and BMP-7 in the Treatment of Atrophic Nonunions. *Clin Orthop Relat Res* (2009) 467: 3239. <https://doi.org/10.1007/s11999-009-0846-2>
- Gielkens P.F.M., Schortinghuis J., de Jong J.R., Huysmans M.Ch.D.N.J.M., van Leeuwen M.B.M., Raghoobar G.M., Bos R.R.M., Stegenga B.: A comparison of micro-CT, microradiography and histomorphometry in bone research. *Archives of Oral Biology.* Volume 53, Issue 6, June 2008, Pages 558-566. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.11.011>

- Gigante A., Setaro N., Rotini M., Finzi S.S., Marinelli M.: Intercondylar eminence fracture treated by resorbable magnesium screws osteosynthesis: A case series. *Injury*. 2018 Nov;49 Suppl 3:S48-S53. doi: 10.1016/j.injury.2018.09.055.
- Gómez S., Vlad M.D., López J., Fernández E.: Design and properties of 3D scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. Volume 42, 15 September 2016, Pages 341-350. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.032>
- Hambli R.: Micro-CT finite element model and experimental validation of trabecular bone damage and fracture. *Bone*. Volume 56, Issue 2, October 2013, Pages 363-374. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.06.028>
- Hara T., Tanck E., Homminga J., Huiskes R.: The influence of microcomputed tomography threshold variations on the assessment of structural and mechanical trabecular bone properties. *Bone*. Volume 31, Issue 1, July 2002, Pages 107-109. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(02\)00782-2](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(02)00782-2)
- He T., Cao C., Xu Z., Li G., Cao H., Liu X., Zhang Ch., Dong Y.: A comparison of micro-CT and histomorphometry for evaluation of osseointegration of PEO-coated titanium implants in a rat model. *Scientific Reports* volume 7, Article number: 16270 (2017)
- Helder M.N. van Esterik F.A.S., Kwehandjaja M.D., Ten Bruggenkate C.M., Klein-Nulend J., Schulten E.A.J.M.: Evaluation of a new biphasic calcium phosphate for maxillary sinus floor elevation: Micro-CT and histomorphometrical analyses. *Clin Oral Implants Res*. 2018 May;29(5):488-498. doi: 10.1111/clr.13146.
- Hildebrand T., Rüegsegger P.: A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *Journal of Microscopy*. 1997, 185(1), 67-75. doi: 10.1046/j.1365-2818.1997.1340694.x
- Hildebrand T., Rüegsegger P.: Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*. 1997;1(1):15-23.
- Ho S. T., Hutmacher D. W. (2006): A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials*, 27(8), 1362-1376. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.08.035
- Holdsworth D.W., Thornton M.M.: Micro-CT in small animal and specimen imaging. *Trends in Biotechnology*. Volume 20, Issue 8, 1 August 2002, Pages S34-S39.
- Ho-Shui-Ling A., Bolander J., Rustom L.E., Johnson A.W., Luyten F.P., Picart C.: Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*. 2018 Oct;180:143-162. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.017
- Howie R.N., Borke J.L., Kurago Z., Daoudi A., Cray J., Zakhary I.E., Brown T.L., Raley J.N., Tran L.T., Messer R., Medani F., Elsalanty M.E.: A Model for Osteonecrosis of the Jaw with Zoledronate Treatment following Repeated Major Trauma. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0132520.
- Hutmacher D.W.: Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(24):2529-43.
- Chackartchi T., Iezzi G., Goldstein M., Klinger A., Soskolne A., Piattelli A., Shapira L.: Sinus floor augmentation using large (1-2 mm) or small (0.25-1 mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res*. 2011 May;22(5):473-80. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02032.x

- Chappard D, Guillaume B, Mallet R, Pascaretti-Grizon F, Baslé MF, Libouban H.: Sinus lift augmentation and beta-TCP: a microCT and histologic analysis on human bone biopsies. *Micron*. 2010 Jun;41(4):321-6. doi: 10.1016/j.micron.2009.12.005. Epub 2009 Dec 22.
- Cheung L.K., Chow L.K., Chiu WK.: A randomized controlled trial of resorbable versus titanium fixation for orthognathic surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Oct;98(4):386-97.
- Iida T., Silva E.R., Lang N.P., Apaza Alccayhuaman K.A., Botticelli D., Xavier S.P.: Histological and micro-computed tomography evaluations of newly formed bone after maxillary sinus augmentation using a xenograft with similar density and mineral content of bone: An experimental study in rabbits. *Clin Exp Dent Res*. 2018 Nov 23;4(6):284-290. doi: 10.1002/cre2.146. eCollection 2018 Dec.
- Itälä A.I., Ylänen H.O., Ekholm C., Karlsson K.J., Aro H.T.: Pore diameter of more than 100 µm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research*. 31 July 2002; <https://doi.org/10.1002/jbm.1069>
- Ito M., Nakamura T., Matsumoto T., Tsurusaki K., Hayashi K.: Analysis of trabecular microarchitecture of human iliac bone using microcomputed tomography in patients with hip arthrosis with or without vertebral fracture. *Bone* 1998; 23 (2):163-169.
- Jeon H.B., Kang D.H., Gu J.H., Oh S.A.: Delayed Foreign Body Reaction Caused by Bioabsorbable Plates Used for Maxillofacial Fractures. *Arch Plast Surg*. 2016 Jan; 43(1): 40–45. doi: 10.5999/aps.2016.43.1.40
- Jiřík M., Bartoš M., Tomášek P., Malečková A., Kural T., Horáková J., Lukáš D., Suchý T., Kochová P., Hubálek Kalbáčová M., Králíčková M., Tonar Z.: Generating standardized image data for testing and calibrating quantification of volumes, surfaces, lengths, and object counts in fibrous and porous materials using X-ray microtomography. *Microsc Res Tech*. 2018 Jun;81(6):551-568. doi: 10.1002/jemt.23011. Epub 2018 Feb 24.
- Jones A.C., Arns Ch.H., Hutmacher D.W., Milthorpe B.K., Sheppard A.P., Knackstedt M.A.: The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. *Biomaterials*. Volume 30, Issue 7, March 2009, Pages 1440-1451 <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.056>
- Jones A.C., Arns Ch.H., Sheppard A.P., Hutmacher D.W., Milthorped B.K., Knackstedt M.A.: Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT. *Biomaterials*. Volume 28, Issue 15, May 2007, Pages 2491-2504. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.01.046
- Jones A.C., Milthorpe B., Averdunk H., Limaye A., Senden TJ., Sakellariou A., Sheppard A.P., Sok R.M., Knackstedt M.A., Brandwood A.: Analysis of 3D bone ingrowth into polymer scaffolds via micro-computed tomography imaging. *Biomaterials*. 2004. 25(20):4947–4954
- Karssemakers L.H.E., Nolte J.W., Tuinzing D.B., Langenbach G.E.J., Raijmakers P.G., Becking A.G.: Microcomputed tomographic analysis of human condyles in unilateral condylar hyperplasia: increased cortical porosity and trabecular bone volume fraction with reduced mineralisation. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. Volume 52, Issue 10, December 2014, Pages 940-944
- Khimchenko A., Deyhle H., Schulz G., Schweighauser G., Hench J., Chicherova N., Bikis C., Hieber S.E., Müller B.: Extending two-dimensional histology into the third dimension through conventional micro computed tomography. *Neuroimage*. 2016 Oct 1;139:26-36. doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.06.005

- Kim K.T., Eo M.Y., Nguyen T.T.H., Kim S.M.: General review of titanium toxicity. *Int J Implant Dent*. 2019 Mar 11;5(1):10. doi: 10.1186/s40729-019-0162-x.
- Kolesová H., Bartoš M., Hsieh W.C., Olejníčková V., Sedmera D.: Novel approaches to study coronary vasculature development in mice. *Developmental Dynamics* 247 (8), 1018-1027
- Kraus T., Fischerauer S.F., Hänzli A.C., Uggowitzer P.J., Löffler J.F., Weinberg A.M.: Magnesium alloys for temporary implants in osteosynthesis: In vivo studies of their degradation and interaction with bone. *Acta Biomaterialia*. Volume 8, Issue 3, March 2012, Pages 1230-1238.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.008>
- Lambotte A: L'utilisation du magnésium comme matériel perdu dans l'ostéosynthèse. *Bull et Mem de la Soc Nat de Chirurgie* 28: 1325-1334, 1932
- Lan Levengood S.K., Polak S.J., Poellmann M.J., Hoelzle D.J., Makic A.J., Clark S.G., Wheeler M.B., Wagoner Johnson A.J.: The effect of BMP-2 on micro- and macroscale osteointegration of biphasic calcium phosphate scaffolds with multiscale porosity. *Acta Biomaterialia*. Volume 6, Issue 8, August 2010, Pages 3283-3291. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.026>
- Lan Levengood S.K., Polak S.J., Wheeler M.B., Maki A.J., Clark S.G., Jamison R.D., Wagoner Johnson A.J.: Multiscale osteointegration as a new paradigm for the design of calcium phosphate scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials*. Volume 31, Issue 13, May 2010, Pages 3552-3563.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.052>
- Landis, E.N., Keane, D.T.: X-ray microtomography, *Materials Characterization*. 61 (2010) 1305-1316.
- Lappalainen O., Karhula S.S., Haapea M., Kauppinen S., Finnälä M., Saarakkala S., Serlo, Sándor G.K.: Micro-CT Analysis of Bone Healing in Rabbit Calvarial Critical-Sized Defects with Solid Bioactive Glass, Tricalcium Phosphate Granules or Autogenous Bone. *J Oral Maxillofac Res*. 2016 Apr-Jun; 7(2): e4.
- Larrue A., Rattner A., Peter Z.A., Olivier C., Laroche N., Vico L., Peyrin F.: Synchrotron radiation micro-CT at the micrometer scale for the analysis of the three-dimensional morphology of microcracks in human trabecular bone. *PLoS One*. 2011;6(7):e21297. doi: 10.1371/journal.pone.0021297
- Lee K., Silva E.A., Mooney D.J.: Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J R Soc Interface*. 2011 Feb 6;8(55):153-70. doi: 10.1098/rsif.2010.0223. Epub 2010 Aug 18.
- Limbert G., van Lierde C., Muraru O.L., Walboomers X.F., Frank M., Hansson S., Middleton J., Jacques S.: Trabecular bone strains around a dental implant and associated micromotions—A micro-CT-based three-dimensional finite element study. *Journal of Biomechanics*. Volume 43, Issue 7, 7 May 2010, Pages 1251-1261. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2010.01.003>
- Liu H., Li W., Liu Y.S., Zhou Y.S.: Bone micro-architectural analysis of mandible and tibia in ovariectomized rats: a quantitative structural comparison between undecalcified histological sections and micro-CT. *Bone Joint Res*. 2016. 5, 253–262.
- Mandrycky Ch., Wang Z., Kim K., Kim D.: 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*. Volume 34, Issue 4, July–August 2016, Pages 422-434.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>

- McClatchy D.M., Zuurbier R.A., Wells W.A., Paulsen K.D., Pogue B.W.: Micro-computed tomography enables rapid surgical margin assessment during breast conserving surgery (BCS): correlation of whole BCS micro-CT readings to final histopathology. *Breast Cancer Res Treat.* 2018 Dec;172(3):587-595. doi: 10.1007/s10549-018-4951-3
- Meganck J.A., Kozloff K.M., Thornton M.M., Broski S.M., Goldstein S.A.: Beam hardening artifacts in micro-computed tomography scanning can be reduced by X-ray beam filtration and the resulting images can be used to accurately measure BMD. *Bone.* Volume 45, Issue 6, December 2009, Pages 1104-1116 <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.07.078>
- Meijer G.J., de Bruijn J.D., Koole R, van Blitterswijk C.A.: Cell-based bone tissue engineering. *PLoS Med.* 2007 Feb;4(2):e9.
- Metscher B.D., Muller G.B.: MicroCT for Molecular Imaging: Quantitative Visualization of Complete Three-Dimensional Distributions of Gene Products in Embryonic Limbs. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* 240:2301–2308, 2011
- Metscher, B.D.: MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC Physiology* 2009,9:11. doi:10.1186/1472-6793-9-11
- Moraes V.Y., Lenza M., Tamaoki M., Faloppa F., Bellotti J.: Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *COCHRANE*, 2014
- Mouriño V., Boccaccini A.R.: Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. *J R Soc Interface.* 2010 Feb 6;7(43):209-27. doi: 10.1098/rsif.2009.0379
- Murphy C.M., Haugh M.G., O'Brien F.J.: The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* Volume 31, Issue 3, January 2010, Pages 461-466. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.063>
- Mustafy T., Benoit A., Londono I., Moldovan F., Villemure I.: Can repeated in vivo micro-CT irradiation during adolescence alter bone microstructure, histomorphometry and longitudinal growth in a rodent model? *PLoS One.* 2018 Nov 15;13(11):e0207323. doi: 10.1371/journal.pone.0207323. eCollection 2018.
- Oest M.E., Dupont K.M., Kong H.J., Mooney D.J., Guldberg R.E.: Quantitative assessment of scaffold and growth factor-mediated repair of critically sized bone defects. *Orthop Res.* 2007 Jul;25(7):941-50.
- Offeddu G.S., Ashworth J.C., Cameron R.E., Oyen M.L.: Structural determinants of hydration, mechanics and fluid flow in freeze-dried collagen scaffolds. *Acta Biomaterialia.* Volume 41, 1 September 2016, Pages 193-203. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.05.024>
- Oransky I.: Sir Godfrey N. Hounsfield. *Lancet.* 2004 Sep 18-24;364(9439):1032.
- Park Y.W.: Bioabsorbable osteofixation for orthognathic surgery. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2015 Feb 19;37(1):6. doi: 10.1186/s40902-015-0003-7
- Perilli E., Le V., Ma B., Salmon P., Reynolds K., Fazzalari N. L.: Detecting early bone changes using in vivo micro-CT in ovariectomized, zoledronic acid-treated, and sham-operated rats. *Osteoporosis International.* August 2010, Volume 21, Issue 8, pp 1371–1382
- Peyrin F. (2011): Evaluation of bone scaffolds by micro-CT. *Osteoporosis International*, 22(6), 2043-2048. doi: 10.1007/s00198-011-1609-y
- Pimenta M.A., Frasca L.C., Lopes R., Rivaldo E.: Evaluation of marginal and internal fit of ceramic and metallic crown copings using x-ray microtomography (micro-CT) technology. *J Prosthet Dent.* 2015 Aug;114(2):223-8. doi: 10.1016/j.prosdent.2015.02.002

Polak S.J., Candido S., Lan Levengood S.K., Wagoner Johnson A.J.: Automated segmentation of micro-CT images of bone formation in calcium phosphate scaffolds. *Computerized Medical Imaging and Graphics*. Volume 36, Issue 1, January 2012, Pages 54-65.

<https://doi.org/10.1016/j.compmedimag.2011.07.004>

Pyka G., Kerckhofs G., Schrooten J., Wevers M.: The effect of spatial micro-CT image resolution and surface complexity on the morphological 3D analysis of open porous structures. *Materials Characterization*. 2014, 87:104-115

Qiu S.Q., Dorrius M.D., de Jongh S.J., Jansen L., de Vries J., Schröder C.P., Zhang G.J., de Vries E.G.E., van der Vegt B., van Dam G.M.: Micro-computed tomography (micro-CT) for intraoperative surgical margin assessment of breast cancer: A feasibility study in breast conserving surgery. *Eur J Surg Oncol*. 2018 Nov;44(11):1708-1713. doi: 10.1016/j.ejso.2018.06.022

Recker R.R., Akhter M.P., Lappe J.M., Watson P.: Bone histomorphometry in transiliac biopsies from 48 normal, healthy men. *Bone*. 2018 Jun;111:109-115. doi: 10.1016/j.bone.2018.03.019

Reilly G.C., Engler A.J.: Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *Journal of Biomechanics*. Volume 43, Issue 1, 5 January 2010, Pages 55-62.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.009>

Rémy É., Thiel É. (2002): Medial axis for chamfer distances: computing look-up tables and neighbourhoods in 2D or 3D. *Pattern Recognition Letters*, 23(6), 649-661. doi: 10.1016/S0167-8655(01)00141-6

Rezai-Rad M., Bova J.F., Orooji M., Pepping J., Qureshi A., Del Piero F., Hayes D., Yao S.: Evaluation of bone regeneration potential of dental follicle stem cells for treatment of craniofacial defects. *Cytotherapy*. Volume 17, Issue 11, November 2015, Pages 1572-1581

Rhodes J.S., Ford T.R., Lynch J.A., Liepins P.J., Curtis R.V.: Micro-computed tomography: a new tool for experimental endodontology. *Int Endod J*. 1999 May;32(3):165-70.

Ria S., Cox M.J., Quinn B.F., San Diego J.P., Bakir A., Woolford M.J.: A Scoring System for Assessing Learning Progression of Dental Students' Clinical Skills Using Haptic Virtual Workstations. *J Dent Educ*. 2018 Mar;82(3):277-285. doi: 10.21815/JDE.018.028

Ritman E.L.: Current Status of Developments and Applications of Micro-CT. *Annu. Rev. Biomed. Eng*. 2011. 13:531-52,

Rödig T., Reicherts P., Konietschke F., Dullin C., Hahn W., Hülsmann M.: Efficacy of reciprocating and rotary NiTi instruments for retreatment of curved root canals assessed by micro-CT. *Int Endod J*. 2014 Oct;47(10):942-8. doi: 10.1111/iej.12239

Roseti L., Parisi V., Petretta M., Cavallo C., Desando G., Bartolotti I., Grigolo B.: Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering: C*. Volume 78, 1 September 2017, Pages 1246-1262. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>

Rustom L.E., Poellmann M.J., Wagoner Johnson A.J.: Mineralization in micropores of calcium phosphate scaffolds. *Acta Biomaterialia*. Volume 83, 1 January 2019, Pages 435-455

Saffarzadeh A., Gauthier O., Bilban M., Bagot D'Arc M., Daculsi G.: Comparison of two bone substitute biomaterials consisting of a mixture of fibrin sealant (Tisseel) and MBCP (TricOs) with an autograft in sinus lift surgery in sheep. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Oct;20(10):1133-9. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01738.x

Salmon P.L., Buelens E., Sasov A.Y.: Performance of In Vivo Micro-CT Analysis of Mouse Lumbar Vertebral and Knee Trabecular Bone Architecture. *J. Bone Miner. Res.*, 2003, 18 (suppl. 2) S256.

- Salmon P.L., Ohlsson C., Shefelbine S.J., Doube M.: Structure Model Index Does Not Measure Rods and Plates in Trabecular Bone. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015; 6: 162. doi: 10.3389/fendo.2015.00162
- Sandino C., Lacroix D.: A dynamical study of the mechanical stimuli and tissue differentiation within a CaP scaffold based on micro-CT finite element models. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. July 2011, Volume 10, Issue 4, pp 565–576
- Shepherd D.V., Shepherd J.H., Best S.M., Cameron R.E.: 3D imaging of cells in scaffolds: direct labelling for micro CT. *J Mater Sci Mater Med*. 2018 Jun 12;29(6):86. doi: 10.1007/s10856-018-6089-6.
- Schaller B., Saulacic N., Imwinkelried T., Beck S., Liu E.W.Y., Gralla J., Nakahara K., Hofstetter W., Iizuka T.: In vivo degradation of magnesium plate/screw osteosynthesis implant systems: Soft and hard tissue response in a calvarial model in miniature pigs. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. Volume 44, Issue 3, March 2016, Pages 309-317. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2015.12.009>
- Schambach S.J., Bag S., Schilling L., Groden Ch., Brockmann M.A.: Application of micro-CT in small animal imaging. Volume 50, Issue 1, January 2010, Pages 2-13; doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.08.007
- Schladitz K. (2011): Quantitative micro-CT. *Journal of Microscopy*, 243(2), 111-117.
- Schneider M., Seinige C., Pilling E., Rasse M., Loukota R., Stadlinger B., Mai R., Eckelt U.: Ultrasound-aided resorbable osteosynthesis of fractures of the mandibular condylar base: an experimental study in sheep. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. Volume 50, Issue 6, September 2012, Pages 528-532. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2011.10.003>
- Schouten C., Meijer G.J., van den Beucken J.J.J.P., Spauwen P.H.B., Jansen J.A.: The quantitative assessment of peri-implant bone responses using histomorphometry and micro-computed tomography. *Biomaterials*. Volume 30, Issue 27, September 2009, Pages 4539-4549
- Schumann P., Lindhorst D., Wagner M.E., Schramm A., Gellrich N.C., Rücker M.: Perspectives on resorbable osteosynthesis materials in craniomaxillofacial surgery. *Pathobiology*. 2013;80(4):211-7. doi: 10.1159/000348328
- Silva L.D., de Lima V.N., Faverani L.P., de Mendonça M.R., Okamoto R., Pellizzer E.P.: Maxillary sinus lift surgery-with or without graft material? A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2016 Dec;45(12):1570-1576. doi: 10.1016/j.ijom.2016.09.023
- Silva M.J., Brodt M.D., Uthgenannt B.A.: Morphological and mechanical properties of caudal vertebrae in the SAMP6 mouse model of senile osteoporosis. *Bone*. 2004;35:425–431.
- Silva M.M.C.G., Cyster L.A., Barry J.J.A., Yang X.B., Oreffo R.O.C., Grant D.M., Scotchford C.A., Howdle S.M., Shakesheff K.M., Rose F.R.A.J.: The effect of anisotropic architecture on cell and tissue infiltration into tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. Volume 27, Issue 35, December 2006, Pages 5909-5917. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.010>
- Song J.W., Cha J.Y., Bechtold T.E., Park Y.C.: Influence of Peri-implant Artifacts on Bone Morphometric Analysis with Micro-computed Tomography. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2013, Vol. 28 Issue 2, p519-525. 7p.
- Stock, S.R.: *MicroComputed Tomography: Methodology and Applications*. CRC Press, 2009. ISBN 9781420058765.

- Stockmann P., Böhm H., Driemel O., Mühling J., Pistner H.: Resorbable versus titanium osteosynthesis devices in bilateral sagittal split ramus osteotomy of the mandible – the results of a two centre randomised clinical study with an eight-year follow-up. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. Volume 38, Issue 7, October 2010, Pages 522-528. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2010.01.002>
- Stumbras A., Kuliesius P., Januzis G., Juodzbals G.: Alveolar Ridge Preservation after Tooth Extraction Using Different Bone Graft Materials and Autologous Platelet Concentrates: a Systematic Review. *J Oral Maxillofac Res*. 2019 Mar 31;10(1):e2. doi: 10.5037/jomr.2019.10102. eCollection 2019 Jan-Mar.
- Suchý T., Šupová M., Bartoš M., Sedláček R., Piola M., Soncini M., Fiore G.B., Saueroová P., Hubálek Kalbáčová M.: Dry versus hydrated collagen scaffolds: are dry states representative of hydrated states? *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (2018). doi: 10.1007/s10856-017-6024-2
- Swain M.V., Xue J.: State of the Art of Micro-CT Applications in Dental Research. *International Journal of Oral Science* volume 1, pages 177–188 (2009)
- Sweedy A., Bohner M., van Lenthe G.H., Baroud G.: A novel method for segmenting and aligning the pre-and post-implantation scaffolds of resorbable calcium-phosphate bone substitutes. *Acta Biomater*. 2017; 54:441–53.
- Šimůnek A. a kol., Artillis, 3. vydání, přepracované a doplněné, 2017
ISBN-13: 978-80-906794-0-5, ISBN-10: 80-906794-0-4
- Tang D., Tarea R.S., Yang L., Williams D.F., Ou K., Oreffo R.O.C.: Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials*. Volume 83, March 2016, Pages 363-382
- Thavornnyutikarn B., Chantarapanich, N. Sitthiseripratip K., Thouas G.A., Chen Q.: Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques. *Prog. Biomater.*, 3 (2014), pp. 61-102, 10.1007/s40204-014-0026-7
- Thomsen J.S., Laib A., Koller B., Prohaska S., Mosekilde L., Gowin W.: Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. *J Microsc*. 2005 May;218(Pt 2):171-9.
- Tollemar V., Collier Z.J., Mohammed M.K., Lee M.J., Ameer G.A., Reid R.R.: Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. *Genes Dis*. 2016 Mar;3(1):56-71. Epub 2015 Oct 17.
- Umoh J.U., Sampaio A.V., Welch I., Pitelka V., Goldberg H.A., Underhill T.M., Holdsworth D.W.: In vivo micro-CT analysis of bone remodeling in a rat calvarial defect model. *Phys Med Biol*. 2009 Apr 7;54(7):2147-61. doi: 10.1088/0031-9155/54/7/020. Epub 2009 Mar 13.
- Vacanti J. P., Langer R.: Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Molecular medicine - The Lancet*. 1999. Volume 354, Special Issue, S32-S34, July 01. Doi: 10.1016/S0140-6736(99)90247-
- Van Cleynenbreugel T., Schrooten J., Van Oosterwyck H., Vander Sloten J.: Micro-CT-based screening of biomechanical and structural properties of bone tissue engineering scaffolds. *Med Biol Eng Comput*. 2006 Jul;44(7):517-25
- van Lenthe G.H., Hagenmüller H., Bohner M., Hollister S.J., Meinel L., Müller R.: Nondestructive micro-computed tomography for biological imaging and quantification of scaffold–bone interaction in vivo. *Biomaterials*. Volume 28, Issue 15, May 2007, Pages 2479-2490. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.01.017>

Varley M.C., Neelakantan S., Clyne T.W., Dean J., Brooks R.A., Markaki A.E.: Cell structure, stiffness and permeability of freeze-dried collagen scaffolds in dry and hydrated states. *Acta Biomaterialia*. Volume 33, 15 March 2016, Pages 166-175. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.01.041>

Witte F.: Reprint of: The history of biodegradable magnesium implants: A review. *Acta Biomaterialia*. Volume 23, Supplement, 1 September 2015, Pages S28-S40. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.017>

Vojtová L., Zikmund T., Pavlišáková V., Šalplachta J., Kalasová D., Prosecká E., Brtníková J., Židek J., Pavlišák D., Kaiser J.: The 3D imaging of mesenchymal stem cells on porous scaffolds using high-contrasted x-ray computed nanotomography. *J Microsc.* 2019 Mar;273(3):169-177. doi: 10.1111/jmi.12771. Epub 2018 Nov 22.

Wolfová L., Vojtová L., Jurečková L., Kohutová L.: Úvod do tkáňového inženýrství. Česká Republika: MediaBros s.r.o., 2015. ISBN: 978-80-260-9720- 4.

Woodard J.R., Hildore A.J., Lan S.K., Park C.J., Morgan A.W., Eurell J.A.C., Clark S.G., Wheeler M.B., Jamison R.D., Wagoner Johnson A.J.: The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials*, 28 (2007), pp. 45-54

Yu X., Zhao D., Huang S., Wang B., Zhang X., Wang W., Wei X.: Biodegradable magnesium screws and vascularized iliac grafting for displaced femoral neck fracture in young adults. *BMC Musculoskelet Disord* 2015;16:329.

Yu Z., Pestell T.G., Lisanti M.P., Pestell R.G.: Cancer Stem Cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Dec; 44(12): 2144–2151. 2012 Sep 2. doi: 10.1016/j.biocel.2012.08.022

Zagorchev L., Oses P., Zhuang Z.W., Moodie K., Mulligan-Kehoe M.J., Simons M., Couffinhal T.: Micro computed tomography for vascular exploration. *J Angiogenes Res.* 2010 Mar 5;2:7. doi: 10.1186/2040-2384-2-7.

Zavattini A., Mancini M., Higginson J., Foschi F., Pasquantonio G., Mangani F.: Micro-computed tomography evaluation of microleakage of Class II composite restorations: An in vitro study. *Eur J Dent.* 2018 Jul-Sep;12(3):369-374. doi: 10.4103/ejd.ejd_28_18

Zhang K., Fan Y., Dunne N., Li X.: Effect of microporosity on scaffolds for bone tissue engineering. *Regen Biomater.* 2018 Mar; 5(2): 115–124. Published online 2018 Feb 5. doi: 10.1093/rb/rby001

Zhang W., Wang X., Wang S., Zhao J., Xu L., Zhu Ch., Zeng D., Chen J., Zhang Z., Kaplan D.L., Jiang X.: The use of injectable sonication-induced silk hydrogel for VEGF165 and BMP-2 delivery for elevation of the maxillary sinus floor. *Biomaterials*. Volume 32, Issue 35, December 2011, Pages 9415-9424. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.047>

8. Přílohy – práce autora publikované v časopisech s IF